

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nika SLOKAR

**KVANTITATIVNA IN KVALITATIVNA ANALIZA
FENOLNIH SPOJIN TER ANTIOKSIDATIVNI
UČINEK EKSTRAKTOV OLJČNEGA OLJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS
OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF OLIVE OIL EXTRACTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Abramovič in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nika Slokar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 664.34:633.852.73:547.56 (043) = 163.6
KG	oljčno olje/ deviško oljčno olje/ <i>Olea Europaea sativa</i> / ekstrakti deviškega oljčnega olja/ fenolne spojine/ antioksidativna učinkovitost
AV	SLOKAR, Nika
SA	ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ GOLOB, Terezija (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2010
IN	KVANTITATIVNA IN KVALITATIVNA ANALIZA FENOLNIH SPOJIN TER ANTIOKSIDATIVNI UČINEK EKSTRAKTOV OLJČNEGA OLJA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 63 str., 9 pregl., 22 slik, 59 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomske naloge smo pripravili metanolne ekstrakte fenolnih spojin (FS) iz štiriindvajsetih vzorcev deviških oljčnih olj (DOO), ki so izvirala iz Slovenske Istre in otoka Krka. Posamezne in skupne fenolne spojine (sFS) v olju smo najprej kvantitativno in kvalitativno ovrednotili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Koncentracijo sFS smo določili tudi s Folin-Ciocalteu reagentom (F-C) ter rezultate obeh metod med seboj primerjali ter potrdili linearno zvezo ($r = 0,9646$). Nato smo ekstraktom določili antioksidativno učinkovitost (AU) z dvema metodama (analiza sposobnosti lovljenja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikala in analiza sposobnosti redukcije železovega iona). Vsi ekstrakti so pokazali AU. Potrdili smo vpliv sorte oljk na vsebnost nekaterih fenolnih spojin v oljčnem olju. Poleg tega so rezultati pokazali statistično značilno linearno povezavo med sposobnostjo lovljenja prostega DPPH• radikala, ki smo jo izrazili kot koncentracijo FS potrebno za zmanjšanje 50 % vsebnosti DPPH• radikala (ED_{50}), ter skupno vsebnostjo TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A ($r = -0,881$) in skupno vsebnostjo Tyr, DML-Agl-dA, L-Agl-A ($r = -0,620$). Z višanjem redukcijske sposobnosti se veča tudi sposobnost lovljenja prostih radikalov, vendar rezultati statistične obdelave kažejo na slabo povezavo med obema parametroma. Prav tako v naši raziskavi nismo določili statistično značilne linearne povezave med sFS in sposobnostjo lovljenja DPPH• radikala ($r = -0,394$) oz. sposobnostjo redukcije ($r = -0,012$).

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 664.34:633.852.73:547.56 (043) = 163.6
CX olive oil/ virgin olive oil/ *Olea Europaea sativa*/ virgin olive oil extracts/
phenolic compounds/ antioxidant activity
AU SLOKAR, Nika
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/ GOLOB, Terezija (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2010
TI QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC
COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLIVE OIL
EXTRACTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 63 p., 9 tab., 22 fig., 59 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In diploma thesis, the methanol extract of phenol compounds from twenty
four different samples of extra virgin olive oils (VOO) originating from the
Slovenian Istria and the Croatian island Krk were prepared. Particular and
total phenol compounds were quantitatively and qualitatively evaluated by
using the HPLC method. Evaluation of concentration was repeated by using
the Folin-Ciocalteu reagent (F-C). Two results were compared and their linear
correlation ($r = 0,9646$) was confirmed. After that, the antioxidant activity
(AA) of the extracts was defined with the use of two different methods: 2,2-
Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) scavenging capacity and ferric ion
reducing antioxidant power. As all the extracts have shown AA, the
connection between the variety of olives and the content of some phenol
compounds in produced olive oil was confirmed. Besides that, the results have
indicated a statistically significant linear correlation between the DPPH•
radical scavenging capacity, expressed as a concentration of a total phenolic
compound required to scavenge 50 % of DPPH• radical (ED_{50}), the total
content of TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A ($r = -0,881$) and the total content
of Tyr, DML-Agl-dA, L-Agl-A ($r = -0,620$). Together with the increase of
reduction power, radical scavenging capacity is rising. However, a low
correlation between the two parameters was shown by the results of statistic
research. Also the correlation between the concentration of total phenolic
compounds and scavenging capacity of DPPH• radical ($r = -0,394$) or reducing
power ($r = -0,012$) could not have been determined by the research .

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OLJKA IN OLJČNO OLJE.....	3
2.1.1 Oljka in njena zgodovina	3
2.1.2 Oljčno olje	4
2.1.3 Pridelava oljčnega olja	5
2.1.4 Razvrščanje oljčnega olja	6
2.1.4.1 Deviško oljčno olje	7
2.1.4.2 Rafinirano oljčno olje	8
2.1.4.3 Oljčno olje	8
2.1.4.4 Olje oljčnih tropin.....	8
2.2 MAŠČOBNE KISLINE	9
2.2.1 Maščobne kisline v oljčnem olju	9
2.3 FENOLNE SPOJINE	11
2.3.1 Fenolne spojine v oljčnem olju	11
2.3.2 Analitske metode za določanje fenolnih spojin.....	15
2.3.2.1 Določanje posameznih in skupnih fenolnih spojin s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).....	15
2.3.2.2 Spektrofotometrično določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim reagentom	16
2.4 ANTIOKSIDANTI	16
2.4.1 Primarni antioksidanti	17
2.4.2 Sekundarni antioksidanti.....	17
2.4.3 Oksidativna stabilnost oljčnega olja	17
2.4.4 Analitske metode za določanje antioksidativne učinkovitosti	19
2.4.4.1 Sposobnost lovljenja radikala DPPH•	20
2.4.4.2 Sposobnost redukcije železovega iona	22
2.5 OSTALE MINORNE SNOVI V OLJČNEM OLJU	22
2.5.1 Tokoferoli	22
2.5.2 Steroli.....	23

2.5.3	Terpenski ogljikovodiki	23
2.5.4	Voski	23
2.5.5	Alifatski alkoholi.....	23
2.5.6	Aldehydi	24
2.5.7	Triterpenski alkoholi.....	24
2.5.8	Pigmenti.....	24
3	MATERIALI IN METODE DELA	25
3.1	MATERIALI	25
3.1.1	Vzorčenje.....	25
3.1.2	Reagenti, pribor in aparature	26
3.2	NAČRT IN METODE DELA	27
3.1.3	Načrt	27
3.1.4	Metode dela	28
3.1.4.1	Ekstrakcija fenolnih spojin iz olja za analizo s HPLC	28
3.1.4.2	Priprava internega standarda s siringinsko kislino	28
3.1.4.3	Določitev posameznih in skupnih fenolnih spojin v raztopini s HPLC	28
3.1.4.4	Ekstrakcija fenolnih spojin iz olja za določanje skupnih fenolnih spojin in antioksidativne učinkovitosti	29
3.1.4.5	Kvantitativno določanje fenolnih spojin z reagentom Folin-Ciocalteu.....	29
3.1.4.6	Priprava umeritvene krivulje	29
3.1.4.7	Določitev antioksidativne učinkovitosti ekstrakta fenolnih spojin z metodo DPPH•	31
3.1.4.8	Določitev antioksidativne učinkovitosti ekstrakta fenolnih spojin z metodo redukcije železovega iona.....	31
3.1.4.9	Statistična analiza	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33
4.1	DOLOČANJE POSAMEZNIH IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	33
4.1.1	Vsebnost posameznih in skupnih FS (metoda HPLC)	33
4.1.2	Vsebnost sFS (metoda s Folin-Ciocalteu reagentom).....	39
4.2	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI FENOLNIH SPOJIN.	42
4.2.1	Sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH•.....	42
4.2.2	Sposobnost redukcije železovega iona	48
4.2.3	Preverjanje vpliva sorte na vsebnost fenolnih spojin in AU ter povezave med vsebnostjo FS in AU	52
5	SKLEPI	56
6	POVZETEK	57
7	VIRI	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Oljka	3
Slika 2: Oljčni plodovi (oljke)	4
Slika 3: Zaščitni znaki posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil (Cenčič in sod., 2006)	8
Slika 4: Kemijska struktura oleozida, olevropeina in ligstrozida ter njihovi sestavni deli (Ryan in sod., 2002)	12
Slika 5: Razpad olevropeina in ligstrozida (Rovellini in Cortesi, 2002)	14
Slika 6: Kemijska struktura apigenina in luteolina (Ryan in sod., 2005)	15
Slika 7: Princip antioksidativnega delovanja hidroksitirosoala (Butinar, 1999a).....	19
Slika 8: Struktorna formula 2,2-difenil-1-pikrilzil radikala (DPPH [•]) (Prior in sod., 2005)	21
Slika 9: Struktura tokoferolov in tokotrienolov (Woolard in Indyk, 2003)	22
Slika 10: Območja oljarn v slovenski Istri (Društvo Oljkarjev Slovenske Istre, 2006).....	25
Slika 11: Umeritvena krivulja z galno kislino	30
Slika 12: HPLC kromatogram s fenolnimi spojinami v ekstraktu oljčnega olja OL-297-07 (mešane sorte). Spojine so sledeče; 1: TyroOH, 2: Tyr, 3: DMO-Agl-dA, 4: DML-Agl-dA, 5: lignani, 6: O-Agl-A, 7: L-Agl-A (merjeno pri 280 nm), flavonoidi: 8: luteolin, 9: apigenin (merjeno pri 340 nm), IS je interni standard.....	33
Slika 13: Vsebnost znanih in neznanih fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja.....	36
Slika 14: Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja sorte 'Itrska belica'	37
Slika 15: Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja sorte 'Leccino'	37
Slika 16: Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja iz mešanih sort ter vzorcih olja sort 'Oblica' in 'Buga'	38
Slika 17: Primerjava vsebnosti skupnih fenolnih spojin, preračunanih na kg oljčnega olja, določenih s HPLC in F-C metodo.....	42
Slika 18: Delež DPPH [•] , ki je ostal v reakcijski mešanici po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski mešanici.....	43
Slika 19: Odvisnost absorbance (A_{vz517}) od časa inkubacije (t) pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski mešanici.....	47
Slika 20: Vrednosti za masno koncentracijo fenolnih spojin, ki je potrebna za znižanje DPPH [•] za 50 % (ED_{50})	47
Slika 21: Odvisnost absorbance (A_{740}) od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski mešanici	48
Slika 22: Prikaz reduksijske moči (C_R) za preiskovane vzorce	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki za maščobokislinsko sestavo v oljčnem olju (COI, 2006; Butinar in sod., 2004)	10
Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000)	11
Preglednica 3: Oznaka vzorcev, kislost, vsebnost tokoferolov in sorta vzorcev OO.....	26
Preglednica 4: Volumen osnovne raztopine (V), masna koncentracija galne kisline ($\gamma_{g,k}$) v reakcijski mešanici ter vrednosti izmerjene absorbance (A_{765})	30
Preglednica 5: Vsebnost fenolnih spojin (določeno s HPLC in izraženo kot mg/kg oljčnega olja) v preiskovanih vzorcih OO	35
Preglednica 6: Vrednosti za absorbanco A_{786} ter vsebnost sFS v ekstraktih (μg galne kisline/mL raztopine ekstrakta) in v vzorcih OO (mg galne kisline/kg OO)	39
Preglednica 7: Vrednosti za absorbanco $A_{vz\,517}$, pomerjene pri $t = 15$ min in $t = 30$ min, masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$), delež preostalega DPPH \bullet po 30 min inkubacije, naklon linearnega dela premice (k) ter masna koncentracija FS, potrebna za znižanje DPPH \bullet za 50 % (ED_{50})	44
Preglednica 8: Vrednosti za absorbanco (A_{740}) v odvisnosti od koncentracije FS v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$) in reduksijska moč (C_R) ekstraktov oljčnega olja	49
Preglednica 9: Vpliv sorte na vsebnost posameznih in skupnih fenolnih spojin, na sposobnost lovljenja prostih radikalov ter na sposobnost redukcije	53

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	antioxidant activity
AU	antioksidativna učinkovitost
C_r	reduksijska moč
EDOO	ekstra deviško oljčno olje
F-C	Folin-Ciocalteu
FRAP	ferric ion reducing antioxidant power
FS	fenolne spojine
DML-Agl-dA	dimetil ligstrozid aglikon dialdehid
DMO-Agl-dA	dimetil olevropein aglikon dialdehid
DPPH•- 2,2	difenil-1-pikril-hidrazil
DOO	deviško oljčno olje
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
k	smerni koeficient premice
L-Agl-A	ligstrozid aglikon aldehid
L-Agl-dA	ligstrozid aglikon dialdehid
O-Agl-A	olevropein aglikon aldehid
O-Agl-dA	olevropein aglikon dialdehid
<i>o</i> -difenoli	orto difenoli
OO	oljčno olje
sFS	skupne fenolne spojine
Tyr	tirosol
Tyr-OH	hidroksitirosol
VOO	virgin olive oil
γ	masna koncentracija
ZOP	zaščitena označba porekla

1 UVOD

Oljka (*Olea Europaea oleaster*) sodi poleg figovca in vinske trte med prva drevesa, ki jih je človek poskušal podrediti svojim željam in potrebam. Danes ločimo divje in gojene oljke. Slednje dajejo bistveno večje plodove.

Oljke, plodovi oljčnega drevesa, odvisno od sorte, so lahko črne ali zelene barve, različnih velikosti in okusov. V Slovenski Istri prevladujejo predvsem sorte 'Istarska belica', ki je udomačena oz. najbolj razširjena sorta ter 'Leccino', 'Buga', 'Črnica', 'Frantoio'. Plodovi se poleg morfoloških lastnosti razlikujejo tudi po vsebnosti antioksidantov ter ostalih spojin, ki so različno razporejene po delih plodu (povrhnjica, meso in koščica).

Oljčno olje se pridobiva z mehanskim stiskanjem oljk in je po predelavi takoj primerno za uživanje. Takšna olja so deviška in ekstra deviška oljčna olja. Deviško oljčno olje vsebuje 98 % triacilglicerolov (saponifikacijska frakcija) in 2 % minornih snovi (nesaponifikacijska frakcija), ki dajejo olju posebno mesto v zdravi prehrani. Številne zdravilne lastnosti oljčnega olja so opisovali že grški in rimske pisci.

Med maščobnimi kislinami prevladuje enkrat nenasičena oleinska kislina. Zelo pomembne sestavine so v maščobah topni vitamini A, D, E (tokoferoli), K in fenolne spojine. Antioksidanti preprečujejo oksidacijske procese v oljčnem olju in človeškem organizmu. Zaradi visoke vsebnosti naravnih antioksidantov, kot so polarne in nepolarne fenolne spojine, tokoferoli in karotenoidi ter oleinske kisline, ima oljčno olje v primerjavi z ostalimi rastlinskimi olji dobro oksidativno stabilnost.

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti z vsaj enim aromatskim obročem, na katerem je vezana vsaj ena hidroksi skupina. Dokazano je bilo, da so fenolne spojine dobri antioksidanti, saj lovijo proste radikale, tako da oddajo vodikov atom ali elektron, ter imajo sposobnost vezave kovinskih kationov. Orto položaj hidroksi skupine (*o*-fenolne spojine) prispeva k boljši antioksidacijski sposobnosti.

Plodovi oljke vsebujejo največ fenolnih spojin (polifenolov) sekoiridoidnega tipa – olevropein, ligstrozid in njihove razpadne produkte, ki nastajajo pri delovanju hidrolaz, med mesenjem (predelavo) oljk in v samem oljčnem olju.

Fenolne spojine oblikujejo specifično prijetno aroma olja. Njihova vsebnost je pomemben dejavnik pri ocenjevanju kakovosti oljčnega olja. Poleg tega ščitijo olje pred avtooksidacijo nenasičenih maščobnih kislin.

V prehrani so posebej zanimivi tokoferoli in fenolne spojine, ki zmanjšujejo škodljivo delovanje reaktivnih spojin v človeškem organizmu. Raziskave so pokazale, da imajo fenolne spojine v oljčnem olju pozitiven vpliv na človeški organizem, saj ugodno vplivajo na ravnovesje med lipoproteini nizke in visoke gostote (LDL in HDL) in tako zmanjušejo možnost za nastanek kroničnih bolezni. Pripisujejo jim protivnetne, antikancerogene, antimutagene in protimikrobne učinke.

Številne raziskave so pokazale, da določene spojine, prisotne v nesaponifikacijski frakciji, izboljšujejo funkcionalnost oljčnega olja in vzpodbujajo k njegovemu uživanju. Te informacije so lahko uporabne za nadaljnje raziskave in razvoj zdravih in varnih živil z ustrezno antioksidacijsko stabilnostjo ter varovalnim vplivom na človeški organizem.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomske naloge smo želeli iz oljčnega olja pripraviti ekstrakte fenolnih spojin, v ekstraktih določiti posamezne in skupne fenolne spojine ter dokazati njihovo antioksidativno učinkovitost. Poleg tega smo želeli ugotoviti, ali vsebnost posameznih fenolnih spojin vpliva na celotno antioksidativno učinkovitost ekstrakta.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljam, da vsebnost skupnih in posameznih fenolnih spojin v ekstraktu vpliva na antioksidativno učinkovitost ekstrakta. Predpostavljam tudi, da sorta oljk vpliva na vsebnost skupnih in posameznih fenolnih spojin ter na antioksidativno učinkovitost ekstrakta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OLJKA IN OLJČNO OLJE

2.1.1 Oljka in njena zgodovina

Oljčna drevesa so ena najstarejših gojenih dreves. Prva drevesa, kot jih poznamo danes, so uspevala že približno 6000 let pred našim štetjem na področjih Male Azije, Bližnjega vzhoda in severovzhodnega dela Afrike (Egipt, Etiopija, Sudan). Oljčno drevo se pojavlja v legendah, različnih mitologijah, umetnosti in tudi v religijah. Oljka je sveto drevo, simbol miru in znanosti, modrosti in zmage. V grški mitologiji je simbol za božji dar, drevo, ki so ga bogovi z Olimpa podarili človeku.

Zdravilne lastnosti oljke je poznal tudi oče medicine Hipokrat. Že takrat je veljalo, da žlica oljčnega olja na dan okrepi organizem, saj spodbuja prebavo (Bučar - Miklavčič in sod., 1997). Rimljanci so oljčno olje predstavljalo vir zdrave prehrane, saj so bile mnoge jedi pripravljene z dodatki najboljših olj. V rimskem času je v Sredozemlju oljkarstvo doživelo največji razmah (Vidrih - Perko, 2004).



Slika 1: Oljka

Danes oljko gojijo in pridelujejo tam, kjer podnebne razmere to dovoljujejo. Najpomembnejši pridelovalci oljčnega olja so Španija, Italija, Grčija, Tunizija, Turčija, Maroko, Portugalska, Sirija in Alžirija. Oljka uspeva tudi v Sloveniji, Črni Gori, na Hrvaškem, Cipru, v Egiptu, Izraelu, Libiji, Jordaniji, Libanonu, Argentini, Čilu, Mehiki, Peruju, Avstraliji in ZDA. Oljka je rastlina sredozemskega podnebja, za katero so značilne mile, deževne zime ter suha in topla poletja.

Itrske oljčne olje je bilo omenjeno okoli leta 115 pr. n. št. v delu grškega zgodovinarja Pausaniasa. V 16. in 17. stoletju, v času Beneške republike, se je oljkarstvo pri nas ter na območju Dalmacije in Istre močno razmehrilo. Po drugi svetovni vojni je oljkarstvo v Slovenski Istri začelo upadati. Nov zagon je dobilo po osamosvojitvi leta 1991 in v zadnjih trinajstih letih stalno enakomerno narašča (Cenčič in sod., 2006).

Gojena oljka (*Olea Europaea sativa*) se razlikuje od divje oljke (*Olea Europaea oleaster*) po majhnih plodovih in listih ter velikokrat po trnastih vejah. Raste kot spontana rastlina in zaradi močne zmožnosti obnavljanja je lahko stara nekaj stoletij in včasih tudi tisočletja. Lahko ima eno ali več debel, višina drevesa je pa odvisna od sorte, okolja in obrezovanja. V višino zraste od 3 do 15 metrov.

Plodovi so koščičasti, različnih oblik in barve. Barva je odvisna od sorte, rodnosti drevesa in podnebnih razmer. V dozorevanju spreminja barvo od zelene do rumenkaste, rdečkaste, temno vijolične in črne. Nekatere sorte so do konca zelene. Plod je sestavljen iz povrhnjice (epikarp), mesa (mezokarp), koščice (endokarp) in semena. Težak je lahko 0,5–17 g, od tega 70–85 % mase obsega meso, ki vsebuje 12–25 % olja, 69–75 % vode in 4–6 % ogljikovih hidratov. Oljke niso takoj užitne po obiranju, ker so grenkega okusa, ki ga pripisujejo sestavini imenovani olevropein (Bučar - Miklavčič in sod., 1997).



Slika 2: Oljčni plodovi – oljke

2.1.2 Oljčno olje

Oljčno olje ni cenjeno le zaradi gastronomsko kakovosti. Že v starodavnosti so mu pripisovali številne prehranske in zdravilne učinke (Viola, 1997). Številne sodobne znanstvene raziskave prebivalstva Sredozemlja potrjujejo koristnost oljčnega olja, saj zaradi vsebnosti antioksidantov, kot so vitamini in polifenoli, preprečuje nastajanje bolezni srca in ožilja. Tako je mediteranska dieta z oljčnim oljem kot virom energije postala simbol zdrave prehrane (Briante in sod., 2002).

Eden od vzrokov, zakaj je oljčno olje koristno za zdravje, je visoka vsebnost nenasičenih maščobnih kislin. Poleg triacilglicerolov, ki so glavna komponenta oljčnega olja (98 %), vsebuje 2 % minornih snovi. To so snovi, ki dopolnjujejo že tako uravnovezeno triacilglicerolno sestavo DOO. Nastanejo v plodu oljke in so kasneje v različnih kemijskih oblikah in z različnim deležem tudi v OO. Odvisne so od veliko dejavnikov: klime,

padavin, prsti, zrelosti plodov, sorte. Pomembne so za stabilnost olja, za specifičnost arome (vonj, okus in ostale senzorične lastnosti), za ugotavljanje porekla ter imajo pozitiven vpliv pri bioloških funkcijah v človeškem organizmu. Glavne minorne sastavine DOO, ki so netriacilglicerolnega izvora in so netopne v vodi so: terpenski ogljikovodiki, karotenoidi, triterpenski dialkoholi, alifatski alkoholi, steroli, tokoferoli in aromatske spojine (Vesel in sod., 2009; Bučar - Miklavčič, 1999).

Med minorne sestavine, ki so topne v vodi, spadajo fenolne spojine (lignani, flavonoidi in sekoiridoidi) in hidroksi izokromani. K minornim spojinam spadajo tudi diacilgliceroli, monoacilgliceroli, glicerol in proste maščobne kisline, ki so triacilglicerolnega izvora, saj nastanejo pri razpadu triacilglicerolov. Prisotnost slednjih je ena od redkih sestavin, ki je v DOO nezaželjena (Vesel in sod., 2009; Papadopoulos in sod., 2003).

Oljčno olje je lahko prebavljivo, pospešuje izločanje želodčnih sokov in omogoča boljšo adsorpcijo vitaminov, zlasti vitamina E, omejuje razvoj ateroskleroze, zaustavlja razvoj osteoporoze in ohranja elastičnost kože (Vesel in sod., 2009). Poleg visoke vsebnosti fenolnih spojin so zelo pomembne sestavine v maščobah topn vitamin A, D, E, K (Bučar - Miklavčič in sod., 2006).

Za oljčno olje velja uredba komisije (EGS) št. 2568/91 z dopolnili, ki ščiti kakovost oljčnega olja pred potvorbami. Opisani so parametri kakovosti, parametri pristnosti, mejne vrednosti teh parametrov za posamezno kategorijo OO in točno navedene analizne metode (Uredba komisije (EGS) št. 2568/91, 1991).

2.1.3 Pridelava oljčnega olja

Oljčno olje se pridobiva z mehansko predelavo oljk oziroma s hladnim stiskanjem pri temepraturi 27 °C. Pri taki temperaturi še ni sprememb biološko aktivnih snovi.

Predelava plodov poteka v naslednjih fazah (Valenčič, 2004):

- čiščenje plodov: odstranjevanje listov in drugih smeti, pranje plodov,
- priprava oljčne drozge: mletje ali drobljenje, mesenje,
- izločanje oljčnega mošta iz drozge (ekstrakcija): stiskanje ali centrifugiranje (v tej fazi se tropine ločijo od mošta),
- ločitev (separacija) olja iz mošta (v tej fazi se oljčno olje loči od vegetacijske vode).

Med samim postopkom ni dovoljeno dodajati ničesar razen vode. Oljke morajo biti čim prej predelane. Pri ekstra deviškem oljčnem olju (EDDO) z zaščiteno označbo porekla (ZOP) morajo biti oljke predelane v 48 urah od obiranja (Bučar - Miklavčič in sod., 2004).

Oljčno olje je edino olje iztisnjeno iz plodu, ki ga lahko užijemo v deviški obliki, takoj po predelavi, takega, kot ga je izdelala narava. Sem ne sodijo olja, ki se pridobivajo s topili ali postopki rafinacije, mešanja z drugimi olji in olja, pridobljena iz oljčnih tropin (Bučar - Miklavčič in sod., 1997). Z višanjem temperature se pri predelavi izkoristki višajo (Rodošek, 2001). Vendar ni nujno, da so vsa olja, ki so pridobljena s postopkom mehanske predelave, tudi kakovostna, kajti poškodovani, prezreli, fermentirani in plesnivi plodovi so vzrok za visoko kislost oljčnega olja.

2.1.4 Razvrščanje oljčnega olja

Razvrščanje oljčnega olja je odvisno od predelave in kakovosti pridelanega olja. Glede na način predelave oljk, ločimo naslednja oljčna olja (Vesel in sod., 2009):

- deviška oljčna olja,
- rafinirana oljčna olja,
- olja iz oljčnih tropin.

Kakovost DOO se opredeljuje s kemijskimi analizami in senzoričnim ocenjevanjem. DOO je edino med olji, pri katerem je kakovostna razvrstitev odvisna od senzorične ocene. S kemijskimi analizami pa se ugotavlja kakovostne parametre in pristnost olj (Bučar - Miklavčič in sod., 1997).

Kemijski parametri za ugotavljanje kakovosti DOO so (Bučar - Miklavčič in sod., 2006; Vesel in sod., 2009):

- kislost (vsebnost prostih maščobnih kislin v ut. %, izraženih kot oleinska kislina, ki nastanejo z razpadom triacilglicerolov; kazalec kakovosti plodov oz. razgradnje v olju)
- peroksidno število v mmol O₂/kg olja (parameter oksidiranosti olja)
- UV-absorbanca pri 232 nm (K232) in 270 nm (K270) ter razlika (ΔK) med koeficienti K270 (parameter, ki pokaže, ali je olje staro ali ima primes neoljčnega olja)
- sestava maščobnih kislin (ugotavljanje vsebnosti posameznih maščobnih kislin vezanih na glicerol)

Senzorično ocenjevanje poteka po predpisani metodi, ki je navedena v EU uredbi 2568/91. Preskuševalci so usposobljeni in izbrani na podlagi sposobnosti razlikovanja med vzorci olja. Pri ocenjevanju olja morajo imeti ustrezno opremo in primeren ocenjevalni prostor. Olja se razvršča na podlagi mediane napak (Md) in mediane sadežnosti (Ms). Md napak je mediana napake, ki se zazna z največjo intenzivnostjo.

Po ocenjevanju mora vodja komisije zbrati ocenjevalne liste in določiti kategorijo DOO (Vesel in sod., 2009).

Med DOO spadajo naslednje kakovostne razvrstitev (Valenčič 2004; Vesel in sod., 2009):

- ekstra deviško oljčno olje, EDDO z ZOP,
- deviško oljčno olje in
- lampante oljčno olje.

Glede na tehnologijo predelave in kakovost so v maloprodaji naslednje kategorije OO (Vesel in sod., 2009):

- ekstra deviško oljčno olje,
- deviško oljčno olje,
- rafinirano oljčno olje,
- oljčno olje in
- olje iz oljčnih tropin.

2.1.4.1 Deviško oljčno olje

DOO je pridobljeno iz plodu oljke samo z mehanskimi ali drugimi fizikalnimi postopki pri določenih temperaturnih razmerah, ki ne spreminja lastnosti olja (Uredba komisije (EGS) št. 2568/91, 1991).

Ekstra deviško oljčno olje je olje, ki ima kislost $\leq 0,8$ ut. %, peroksidno število ≤ 10 mmol/kg olja; $K_{232} \leq 2,50$, $k_{270} \leq 0,22$, $\Delta K \leq 0,01$; senzorično oceno z $M_d = 0$ in $M_s > 0$. Pridobljeno je s 'hladnim stiskanjem', stiskanjem pri 27°C .

EDOO z ZOP

Živila z ZOP morajo biti pridelana, predelana in pripravljena znotraj določenega geografskega območja. Lastnosti kmetijskega pridelka oziroma živila so izključno ali bistveno rezultat naravnih in človeških dejavnikov tega območja.

Da pridelovalec dobi priznanje označbe Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre z ZOP, mora biti olje znotraj mejnih vrednosti, ki so opredeljene v elaboratu. Območje pridelave, predelave in stekleničenja Ekstra deviškega oljčnega olja Slovenske Istre je geografsko opredeljeno kot Slovenska Istra in je omejeno z zunanjimi mejami treh občin, Koper, Izola in Piran (Cenčič in sod., 2006).

Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre je olje vrhunske kakovosti, ki je pridobljeno iz oljk posebnega sortimenta. Tako olje mora biti pridelano iz sort, ki so dovoljene za pridelavo Ekstra deviškega oljčnega olja Slovenske Istre z ZOP. Sorte so 'Itrska belica' (najmanj 30 %), 'Leccino', 'Buga', 'Črnica', 'Maurino', 'Frantoio' in 'Pendolino'. Značilnosti olja so visoka vsebnost oleinske kisline in nizka vsebnost linolne kisline, aroma sadja, ki spominja na oljko in drugo sadje, ter nekoliko grenak okus in pikantna tipna zaznava.

Slovenska Istra ima take podnebne geografske razmere, ki omogočajo ugodno razmerje med pridobitkom in vsebnostjo fenolnih spojin. 'Itrska belica', ki je predelana v optimalni zrelosti, vsebuje veliko FS (Cenčič in sod., 2006; Vesel in sod., 2009).

Merjene vrednosti so podane za:

- območje pridelave: meje Slovenske Istre,
- količina pridelanih oljk: max 7000 kg/ha,
- sortiment: vsaj 30 % 'Itrske belice',
- varstvo: integrirana ali biološka pridelava,
- obiranje: ročno ali pripomočki, ki ne poškodujejo plodov,
- čas skladiščenja oljk: čas od obiranja do predelave max 48 ur,
- predelava: temperatura predelave mora biti pod 27°C ,
- pridobitek: max 21 %,
- skladiščenje oljčnega olja: temperatura skladiščenja mora biti od 12 do 20°C ,
- ugotavljanje kakovosti oljčnega olja; (kislost oz. vsebnost prostih maščobnih kislin $\leq 0,5$ ut. %, peroksidno število ≤ 7 mmol O_2/kg , vsebnost skupnih fenolov ≥ 100 mg/kg olja, vsebnost oleinske kisline ($\text{C}18:1$) ≥ 72 ut. %, vsebnost linolne kisline ($\text{C}18:2$) $\leq 8,0$ ut. %, $K_{232} \leq 2,5$, $k_{270} \leq 0,2$, $\Delta K \leq 0,01$),

- ugotavljanje pristnosti oljčnega olja: s kemijskimi parametri za pristnost se dokazuje, da oljčnemu olju niso primešane druge kategorije oljčnih olj ali druge vrste olj (Vesel in sod., 2009; Društvo Oljkarjev Slovenske Istre, 2006).



Slika 3: Zaščitni znaki posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil (Cenčič in sod., 2006)

Deviško oljčno olje ima kislost $\leq 2,0$ ut. %; peroksidno število ≤ 10 mmol O₂/kg olja; K232 $\leq 2,60$, K270 $\leq 0,25$, $\Delta K \leq 0,01$; senzorično oceno z Md $\leq 3,5$ in Ms > 0 . DOO slabe kakovosti gre v rafinacijo.

Lampante oljčno olje je neprimereno za prehrano in ima kislost $< 2,0$ ut. %; senzorično oceno z Md $> 3,5$ oziroma Md $\leq 3,5$ in Ms = 0.

Če samo ena značilnost ni skladna z navedenimi vrednostmi, se olje razvrsti v drugo kategorijo ali se šteje za neustrezno (Vesel in sod., 2009).

2.1.4.2 Rafinirano oljčno olje

Rafinirajo se tista DOO, ki zaradi neustreznega skladiščenja, slabe kakovosti plodov in staranja niso primerna za prehrano. Zaradi nadaljnje dezodorizacije, olje zgubi antioksidante (vitamine, fenolne spojine) in postane nestabilno, zato mu dodajo sintetične antioksidante (Vesel in sod., 2009). S postopkom se ne spremeni prvotna struktura triacylglycerolov (Rodošek, 2001).

2.1.4.3 Oljčno olje

Tako olje je mešanica rafiniranega in deviškega oljčnega olja v neopredeljenem deležu in nedefinirani kakovosti DOO.

2.1.4.4 Olje oljčnih tropin

Olje je pridobljeno z mešanjem rafiniranega olja iz oljčnih tropin in deviškega oljčnega olja.

Surovo olje oljčnih tropin je olje oljčnih tropin, ki je pridobljeno s kemijskim postopkom s topili (ekstrakcijo). Za prodajo je tako olje potrebno rafinirati in mu dodati DOO. Nerafinirano olje se uporablja za tehnične namene.

Rafinirano olje iz oljčnih tropin je rafinirano iz surovega oljčnega olja oljčnih tropin. Uporablja se samo ali v mešanici z deviškim oljčnim oljem. Razmerje ni določeno, saj dodatek deviškega oljčnega olja pripomore k svežini.

Olje oljčnih tropin je mešanica rafiniranega olja oljčnih tropin in deviškega olja namenjenega prehrani.

2.2 MAŠČOBNE KISLINE

Maščobne kisline so biološke molekule, ki vsebujejo karboksilno skupino, vezano na nerazvezano ogljikovodikovo verigo. Število ogljikovih atomov v maščobnih kislinah je lahko 4–36. V naravi prevladujejo maščobne kisline z 12–24 ogljikovih atomov, med katerimi so tiste s 16–18 najpogosteje. Ogljikovi atomi so povezani z enojnimi (nasičene maščobne kisline) ali z eno ali več dvojnimi vezmi (nenasičene maščobne kisline).

Osnovna funkcija maščobnih kislin je, da so metabolično gorivo celic. Zaužijemo jih s hrano ali pa jih sintetizira telo samo. V obliki triacilglicerolov jih telo shranjuje za kasnejšo uporabo. Osnovna molekula triacilglicerolov je glicerol, na katero so z estrsko vezjo vezane maščobne kisline. V naravi prevladujejo mešani triacilgliceroli z dvema ali tremi različnimi maščobnimi kislinami. Triacilgliceroli, ki izvirajo iz živalskega tkiva, so trdne maščobe, tisti, ki izvirajo iz rastlinskih semen, pa so olja.

Zdravstvene organizacije priporočajo, naj posamezniki zmanjšajo uživanje nasičenih maščob in raje uživajo živila z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki so prisotne v rastlinskih oljih in nekaterih vrstah rib. Ta živila vsebujejo tudi esencialne maščobne kisline, kot so linolna, linolenska in arahidonska maščobna kislina, ki jih telo ne more samo sintetizirati. Maščobe z nenasičenimi maščobnimi kislinami so pomemben del človeške prehrane (Boyer, 2005).

Danes nasičene maščobne kisline niso zaželene v prehrani, ker povečujejo možnost nastanka bolezni srca in ožilja. Enkrat nenasiciene maščobne kisline so zelo stabilne in v določenih količinah zmanjšujejo možnost nastanka bolezni srca in ožilja. Večkrat nenasiciene maščobne kisline so za človeka zelo pomembne, ker jih organizem ne more sam sintetizirati. Oljčno olje vsebuje visok delež enkrat nenasiciene oleinske kisline, zato je za številne strokovnjake funkcionalno živilo, ki ga je zdravo uživati vsak dan.

2.2.1 Maščobne kisline v oljčnem olju

Na vsebnost maščobnih kislin v oljčnem olju vplivajo različni dejavniki, kot so sorta oljk, letina in pedoklimatske razmere. Najpogosteje maščobne kisline v oljčnem olju so oleinska, palmitinska, linolna, stearinska, palmitoleinska in linolenska kislina. Med vsemi prevladuje enkrat nenasiciena oleinska maščobna kislina, ki daje olju visoko stabilnost pred oksidacijo. Znano je, da večkrat nenasiciene maščobne kisline hitreje oksidirajo, zato

postanejo olja, ki vsebujejo visoko vsebnost nenasičenih kislin, prej žarka (Bučar - Miklavčič, 1999).

V preglednici 1 je prikazana maščobokislinska sestava oljčnega olja, ki je pridobljeno na območju Slovenske Istre iz tam uspevajočih sort (Butinar in sod., 2004). Mednarodni svet za oljkarstvo v tržnem standardu za oljčno olje in olje iz tropin (COI, 2006) navaja širša območja za posamezne maščobne kisline kot jih navajajo Butinar in sod. (2004), saj njihovi podatki temeljijo na rezultatih maščobokislinske sestave v vzorcih olj iz širšega geografskega območja z različnimi pedoklimatskimi razmerami in obširnejšega nabora sort (COI, 2006; Butinar in sod., 2004).

Preglednica 1: Podatki za maščobokislinsko sestavo v oljčnem olju (COI, 2006; Butinar in sod., 2004)

Maščobna kislina	Delež maščobne kisline (ut. %)	
	COI (2006)	Butinar in sod. (2004)
miristinska kislina (C 14:0)	≤ 0,05	0,01
palmitinska kislina (C 16:0)	7,5–20,0	12,64
palmitoleinska kislina (C 16:1) (ω 7)	0,3–3,5	1,01
margarinska kislina (C 17:0)	≤ 0,3	0,06
heptadecenojska kislina (C 17:1)	≤ 0,3	0,10
stearinska kislina (C 18:0)	0,5–5,0	2,56
oleinska kislina (C 18:1) (ω 9)	55,0–83,0	76,53
linolna kislina (C 18:2) (ω 6)	3,5–21,0	5,72
linolenska kislina (C 18:3) (ω 3)	≤ 1,0	0,62
arašidova kislina (C 20:0)	≤ 0,6	0,42
eikozenojska kislina (C 20:1)	≤ 0,4	0,32
behanska kislina (C 22:0)	≤ 0,2	0,12
lignocerinska kislina (C 24:0)	≤ 0,2	0,02

Na hitrost razgradnje triacilglicerolov v diacilglicerole, monoacilglicerole in proste maščobne kisline vplivajo različni dejavniki, kot so zorenje plodov, povišana temperatura, poškodbe plodov in prisotnost vode med pridelavo. Posledica hidrolitičnega razpada in oksidativnih sprememb triacilglicerolov je povečana vsebnost prostih maščobnih kislin in hidroperoksidov. Razpad hidroperoksidov vodi do neprijetnih žarkih arom.

Hidrolitske spremembe potekajo pod vplivom lipaz, kjer nastanejo di- in monoacilgliceroli ter proste maščobne kisline. Pogosteje so **oksidativne spremembe** triacilglicerolov, kjer poteka oksidacija na nenasičenih maščobnih kislinah.

Do oksidacije nenasičenih maščobnih kislin lahko pride tudi, če so te izpostavljene svetlobi. Nastane reaktivni kisik, ki reagira z maščobno kislino, pri čemer nastanejo peroksidi. Reakcija fotoooksidacije je hitrejša od reakcije avtoooksidacije (Klofutar, 1992).

2.3 FENOLNE SPOJINE

Izraz polifenoli označuje take spojine, ki imajo na aromatskem obroču hidroksilne skupine, ki so ključne pri antioksidativnem delovanju. V oljčnih oljih prevladujejo fenoli z dvema hidroksi skupinama na sosednjih ogljikovih atomih, imenovanih orto difenoli (*o*-difenoli) (Butinar in sod., 1999a).

Fenolne spojine lahko razdelimo po številu C-atomov od C₆ do C_n, kot je prikazano v preglednici 2. Enostavni fenoli (C₆) niso zelo razširjeni v naravi. V rastlinah skoraj povsod najdemo fenolne kisline (C₆-C₁), kot so vanilinska, siringinska in galna kislina, fenilacetne kisline (C₆-C₃), kot sta p-kumarna in kavna kislina. Zelo razširjeni so tudi flavonoidi (C₆C₃C₆), vodotopne fenolne spojine, ki so v naravi običajno vezani z različnimi sladkorji v glikozid. Skupine OH na slatkorni komponenti so lahko še zaestrene z alifatsko ali aromatsko kislino. Neslatkorni del molekule v spojini imenujemo aglikon (Abram in Simčič, 1997).

Ker nimajo pomembnejših funkcij v splošnem metabolizmu, jih uvrščamo med sekundarne metabolite. Njihova prisotnost in specifičnost sta odvisni od vrste in sorte rastlin. Oljka je vir mnogih fenolnih spojin s pomembnimi lastnostmi (Ryan in sod., 2002).

Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin po številu C-atomov (Abram, 2000)

št. C-atomov	Osnovni skelet	skupina
6	C ₆	fenoli
7	C ₆ C ₁	fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	fenilacetne kisline
9	C ₆ C ₃	hidroksicimetne kisline fenilpropeni kumarini izokumarini kromoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	lignani neolignani

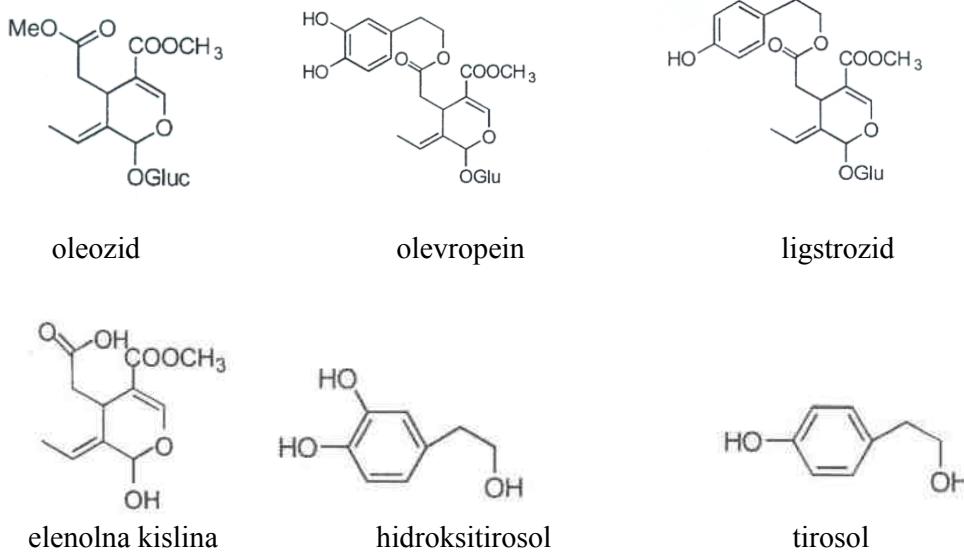
2.3.1 Fenolne spojine v oljčnem olju

Najštevilčnejši polifenoli v oljčnem olju so izoprenoidnega tipa – **sekoiridoidi**, ki so glikozidi monoterpeneskih laktonov. To so snovi, ki so po zgradbi podobne iridoidom, ki imajo šestčlenski heterociklični obroč, povezan s ciklopentanskim obročem.

Sekoiridoidi z eksociklično dvojno vezjo na položaju 8,9 so oleozidi, ki jih najdemo le v družini *Oleaceae*. Oleozidi niso fenoli, vendar z zaestrenjem s fenolnimi snovmi dobijo fenolno skupino (Rovellini in Cortesi, 2002; Butinar in sod., 1999b). Njihova struktturna formula in sestavni deli so prikazani na sliki 4.

Dva pomembnejša sekoiridoida sta olevropein in ligstrozid, ki ju vsebujejo le oljčni plodovi. Vsebnost in vrsta fenolov je v posameznih delih plodov (kožica, meso, koščica) različna (Ryan in sod., 2002). Fenolni aglikoni se zaradi lipofilnih lastnosti med tehnološko predelavo oljk ekstrahirajo v OO (Rovellini in Cortesi, 2002).

Olevropein je glikozid, spojina hidroksitirosolnega estra elenolne kisline z β -D-glukozo. Pri ligstrozidu je enako, le da je fenolni del tirosol. Z zorenjem plodov potekajo encimske hidrolize in koncentracija olevropeina, ki ga je največ na prehodu pomladu v poletje, upada. Ena od mogočih teorij, ki jo omenjajo Ryan in sodelavci (2002) v svojem članku, je zmanjšanje koncentracije olevropeina in povečanje deleža antocianinov zaradi delovanja hidrolitičnih encimov med dozorevanjem plodov. Razgradnja je hitrejša pri zorenju črnih plodov. Encim β -glukozidaza deluje na olevropein in povzroči odcep glukoze, ki je perkurzor za nastanek antocianinov. Nastane aglikon, ki prek vrste reakcij zreagira do končnih stopenj – elenolne kisline in hidroksitirosola. Podobno je pri ligstrozidu, le da je namesto hidroksitirosola prisoten tirosol. Reakcije razgradnje se odvijajo tudi pri mesenju in kasneje pri skladiščenju, kjer nastajata tirosol in hidroksitirosol. Nekateri raziskovalci omenjajo, da zaradi razgradnje olevropein in ligstrozid nista več prisotna v dozorelih plodovih (Ryan in sod., 2002; Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000). V končni stopnji razgradnje nastaneta elenolna kislina in hidroksitirosol oziroma tirosol (Butinar, 2001).



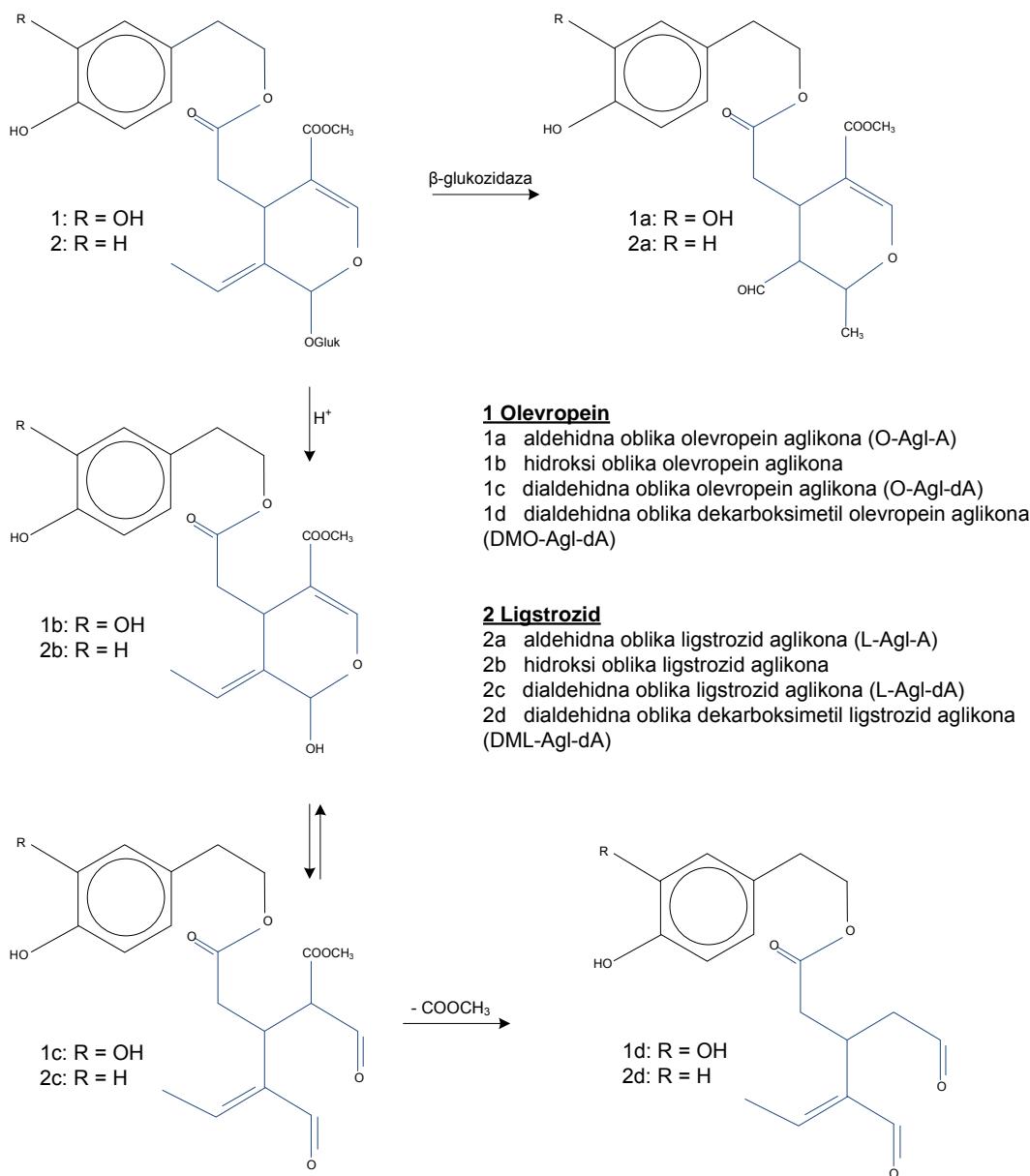
Slika 4: Kemijska struktura oleozida, olevropeina in ligstrozida ter njihovi sestavnici (Ryan in sod., 2002)

Rovellini in Cortesi (2002) navajata dve poti razgradnje olevropeina in ligstrozida do končnih produktov. Prikaz razpada je na sliki 5. Pri prvi poti razgradnje se odcepi glukoza, pri čemer nastane **aldehidna oblika olevropein aglikona (O-Agl-A)**. Reakcijo katalizira encim β -glukozidaza. Pri prvi stopnji druge poti razgradnje poteče hidroliza. Odcepi se glukoza in nastane hidroksi oblika olevropein aglikona. Zaradi nestabilne hidroksi-estrske vezi na obroču elenolne kisline pride do odprtja obroča in nastanka enola, ki izomerizira v odprto aldehidno strukturo. Nastane **dildehidna oblika olevropein aglikona (O-Agl-dA)**. Sledi dekarboksilacija, kjer nastane **dialdehidna oblika dekarboksimetil olevropein**.

aglikona (DMO-Agl-dA). Po istih poteh razpada tudi ligstrozid (**L-Agl-A, L-Agl-dA** in **DML-Agl-dA**), kar je tudi prikazano na sliki 5 (Rovellini in Cortesi, 2002).

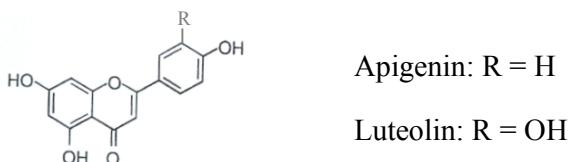
Vse dokler sekoiridoidi ne zreagirajo do svojih končnih oblik (aromatskih alkoholov) tj. tirosola (nastane iz ligstrozida) in hidroksitirosola (nastane iz olevropeina), so olja lahko senzorično bogata in skladna. S spektrofotometrično metodo lahko v olju, v katerem sta olevropein in ligstrozid že dosegla konec razgradne poti, še vedno določimo relativno veliko vsebnost skupnih polifenolov, vendar je olje že pusto in po navadi tudi antioksidativno šibko, saj v njem prevladuje tirosol, ki nima antioksidativnih značilnosti (Bandelj - Mavšar in sod., 2005).

Tako olje je že izgubilo svojo svežino in harmonično aromo, polifenoli pa nimajo več takšne antioksidativne učinkovitosti, kot so jo imeli v svežem olju (Bešter, 2007).



Slika 5: Razpad olevropeina in ligstrozida (Rovellini in Cortesi, 2002)

Poleg sekoiridoidov se v olje ekstrahirajo tudi verbaskozid in podobne spojine. Prisotne so tudi enostavne spojine, kot so tirosol, hidroksitirosol, ferulna in galna kislina (Ryan in sod., 2002) in manjše količine **flavonoidov** (luteolin, apigenin), **lignanov** (pinoresinol, acetoksipinoresinol in hidroksipinoresinol) ter **enostavnih fenolov** (cimetna kislina, ferulna kislina, galna kislina, kavna kislina) (Bešter, 2007).



Slika 6: Kemijska struktura apigenina in luteolina (Ryan in sod., 2005)

Na količino fenolnih spojin v sveže stisnjениh oljčnih oljih vplivajo predvsem stopnja dozorelosti oljčnih plodov (zrelejši plodovi vsebujejo manj polifenolov), sorta, splošno stanje oljčnih plodov pred stiskanjem (nepoškodovanost plodov), klimatski pogoji, način predelave, saj uporaba velikih količin vode zmanjša količino fenolnih spojin v oljih (Butinar in sod., 1999a, Butinar in sod., 199b; Rodošek, 2001).

Količina fenolnih spojin variira od sorte do sorte (od manj kot 100 mg/kg olja do več kot 600 mg/kg). Grenek okus in pikantna tipna zaznava sta izrazitejša pri oljčnih oljih, ki vsebujejo več kot 300 mg fenolnih spojin/kg olja (Tsimidou in sod., 2003).

2.3.2 Analitske metode za določanje fenolnih spojin

2.3.2.1 Določanje posameznih in skupnih fenolnih spojin s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC je kromatografska metoda, ki se uporablja za določanje in prepoznavanje različnih spojin v živilskih vzorcih. Metoda je idealna za spojine, ki so toplotno občutljive, nehlapne in močno polarne, saj določanje le-teh poteka pri sobni temperaturi (Gratzfeld - Hüsen in Schuster, 2001). Tekočinska kromatografija temelji na ločbi komponent v vzorcu oziroma na razliki v hitrosti migracije posameznih komponent pod vplivom mobilne tekoče faze zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na trdni stacionarni fazi (Rudan - Tasić in Klofutar, 2007). Stacionarna faza je nameščena na inertnem nosilcu v notranjosti kolone, skozi katero potuje tekoča mobilna faza. HPLC z UV-detektorjem je med priljubljenimi za analizo ekstraktov iz oljčnih olj (Pirisi in sod., 2000).

Glede na lastnost spojine, kot je polarnost in s tem povezana topnost, se izbere mobilno in stacionarno fazo. Fenolne spojine so polarne snovi, ki so topne v polarnih topilih. Pri ločevanju fenolnih spojin se uporablja 'reverznofazno' kromatografijo (tekoča polarna mobilna faza in nepolarna trdna stacionarna faza). Mobilna faza se dovaja na začetek kolone, teče po koloni, z njo pa tudi raztopljljene snovi, ki so predhodno nanesene na začetek stacionarne faze, z različno hitrostjo in ločeno iztekajo iz kolone. Topljenec se porazdeli med obema fazama zaradi različne topnosti (polarnost) v stacionarni in mobilni fazah. Različni topljenci se med seboj ločijo, ker potujejo z različno hitrostjo zaradi različno močnih vezi med topljencem in stacionarno oz. mobilno fazo.

Detektorji merijo količino snovi, ki se eluirajo iz kolone. Meritev poteka kontinuirno, ker je čas zadrževanja spojine (retencijski čas) na koloni karakterističen za določeno komponento (spojo). UV-detektor meri absorpcijo svetlobe vsled prisotnega topljenca. Rezultat kromatografskega eksperimenta je kromatogram. Kromatogram daje podatke o kompleksnosti vzorca (število vrhov oz. pikov), kvalitativni sestavi vzorca (polozaj vrhov),

kvantitativni sestavi vzorca (površina vrhov) in kvaliteti kolone (Rudan - Tasič in Klofutar, 2007).

Pri kvalitativnem določevanju se retencijske čase vrhov v vzorcu primerja z retencijskimi časi vrhov standarda. Tako se lahko s piki standarda identificira spojine v vzorcu, ki imajo isti retencijski čas kot spojine v standardu. Tako določevanje ni popolnoma zanesljivo pri vzorcih, ki imajo veliko neznanih spojin, ker je mogoče, da se pod posameznim vrhom skriva več komponent. Pri kvantitativni določitvi spojin (integracija) v vzorcu se primerja višino ali površino posameznega vrha v kromatogramu vzorca z višino ali površino vrha standarda (Rudan - Tasič in Klofutar, 2007).

2.3.2.2 Spektrofotometrično določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim reagentom

Metoda s Folin-Ciocalteujevim reagentom sodi med starejše metode, s katero se določa skupne fenolne spojine v vzorcih hrane in zdravilnih rastlinah. Fenolne spojine lahko reagirajo s F-C reagentom le v bazičnih pogojih. Zaradi relativne enostavnosti se ta spektrofotometrična metoda zelo pogosto uporablja. Metoda temelji na disociaciji fenolnega protona (nastane fenolatni ion), ki vodi do redukcije F-C reagenta.

Reducirane komponente F-C reagenta (molbiden (VI)) (Mo(VI)) z maksimalnim absorpcijskim maksimumom okoli 750 nm se obarvajo modro:



Izmerjena absorbanca je premosorazmerna koncentraciji fenolnih spojin oziroma reducirane F-C reagenta. Z izmerjeno absorbanco lahko s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo naredimo z izbrano komercialno dostopno fenolno spojino, izračunamo koncentracijo skupnih fenolov v vzorcu (Huang in sod., 2005; Abdel - Hameed, 2009).

Slabost te metode je, da lahko določimo več fenolnih spojin kot jih je dejansko, saj F-C reagent ni specifičen in lahko poleg fenolnih spojin reagira tudi z ogljikovimi hidrati, karotenoidi, aminokislinami, vitaminom C, itd. (Prior in sod., 2005).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidacijo snovi, tako da vežejo proste radikale, kelirajo kovinske ione, odstranjujejo in/ali popravljajo oksidativno poškodovane biomolekule. Nekatere proste radikale, ki nastanejo iz kisika in vodikovega peroksida v običajnih fizioloških pogojih, imenujemo reaktivne kisikove zvrsti (Boyer, 2005).

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. So zelo reaktivne spojine, saj hitro reagirajo z drugimi spojinami tako, da poskušajo odvzeti za stabilnost potrebnii elektron. Ko določena spojina zgubi elektron, postane sama prosti radikal, kar sproži verižno reakcijo (Halliwell, 1991). Tako nastanejo; superoskidni ion O[•], hidroksilni HO[•], hidroperoksilni HOO[•], alkoksilni RO[•], alkilperoksilni ROO[•],

peroksinitrilni OONO[•] radikal ali še drugi radikali. Prosti radikali reagirajo z lipidi, beljakovinami in DNA (Abram, 2000).

Porušeno ravnotežje med antioksidanti in prostimi radikali imenujemo oksidativni stres. Antioksidante lahko organizem sintetizira sam (endogeni) ali pa jih dobi s hrano (eksogeni).

Antioksidante lahko razdelimo na primarne in sekundarne.

2.4.1 Primarni antioksidanti

So spojine, ki preprečujejo oz. zavirajo proces oksidacije tako, da reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije. Tvorbo peroksidnih radikalov ali pa hidroperoksidov antioksidant onemogoči tako, da odda vodikov atom ali elektron prostemu radikalu in prekine avtooksidacijo. V to vrsto antioksidantov spadajo encimi, ki nastajajo v organizmu (superoksid dismutaza, katalaza), ter nekateri fenoli in njihovi derivati (Raspor in sod., 2000).

2.4.2 Sekundarni antioksidanti

Te snovi reagirajo s prostimi kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, razgrajujejo hidroperokside do komponent, ki niso prosti radikali, absorbirajo UV svetlubo in deaktivirajo aktivni kisik. Predstavniki sekundarnih antioksidantov so fenoli, tokoferoli, karotenoidi in nekatere druge naravne spojine (Raspor in sod., 2000).

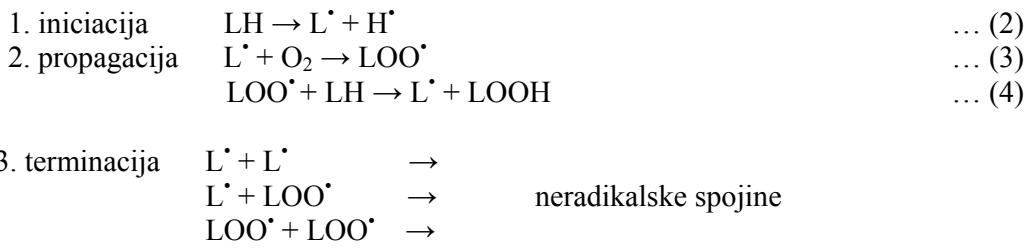
2.4.3 Oksidativna stabilnost oljčnega olja

Oksidativna stabilnost je vzdržljivost na oksidacijo pod različnimi pogoji (Velasco in sod., 2004). Lipidna oksidacija je glavni vzrok za kvar olja in maščob. Produkti primarne oksidacije so hidroperoksi. Te spojine so zelo nestabilne in nadalje reagirajo v sekundarne produkte, kot so ogljikovodiki, alkoholi, ketoni in aldehydi, kateri se lahko oksidirajo v karboksilne kislino. Oksidativna stabilnost oljčnega olja je odvisna od koncentracije polifenolov, zlasti od sekoiridoidnih fenolniorjih spojin (Bešter in sod., 2008). Med fazo počasnega napredovanja oksidacije se največ sprememb zgodi na fenolnih spojinah in tokoferolih. Šele ko se njihova količina zmanjša, se začnejo dogajati spremembe na maščobnih kislino. Vsebnost *o*-polifenolov in tokoferolov je najboljši pokazatelj stabilnosti oljčnega olja. K oksidacijski stabilnosti EDOO največ prispevajo *o*-difenoli, kot sta hidroksitirosol in kavna kislina (Guetierrez in sod., 2002).

Pomembna spojina je tudi α -tokoferol, ki ščiti olje pred oksidacijo pri povišanih temperaturah (Bešter in sod., 2008).

Avtooksidacijski proces v oljčnem olju se začne z zelo počasno začetno stopnjo (inicijacija), ki ji sledi nagel porast oksidacijskih produktov (prostih radikalov), ki so zelo reaktivni (Papadimitriou in sod., 2006).

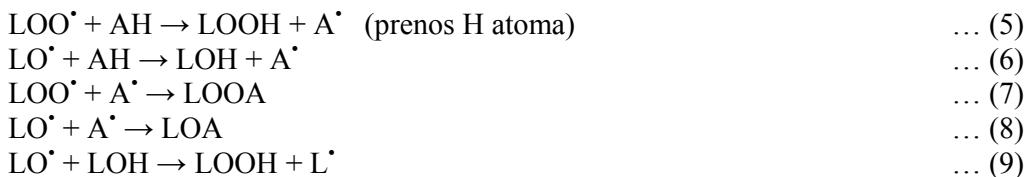
Avtooksidacija lipidov, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline (LH), poteka v treh stopnjah (Abram in Simčič, 1997):



L^\cdot je radikal maščobne kisline, H^\cdot je radikal vodika, LOO^\cdot je lipidni peroksilni radikal.

Polifenoli imajo idealno kemijsko strukturo za lovljenje prostih radikalov. Raziskave so pokazale, da so učinkovitejši antioksidanti *in vitro* kot vitamina C in E (Rice - Evans in sod., 1997). So izjemno pomembni, ker preprečujejo oksidacijske procese tako v olju kot v človeškem organizmu (Bučar - Miklavčič in sod., 2006).

Fenolne spojine so naravni antioksidanti (AH). Zavirajo avtooksidacijsko pot nenasičenih maščobnih kislin tako, da prekinjajo avtooksidacijsko radikalsko verigo s tvorbo 'novih' radikalov. Zanje predpostavlja, da zaustavljajo oksidacijo lipidov, ker odcepijo vodik na hidroksilni skupini in ga oddajo lipidnim peroksilnim radikalom (Abram, 2000):



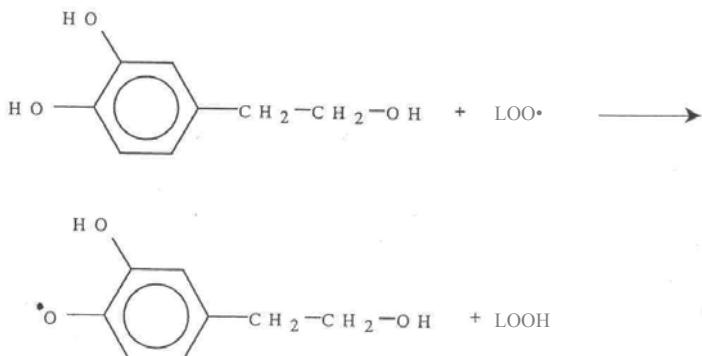
$LOOH$ je lipidni hidroperoksid, A^\cdot je fenoksilni radikal.

Princip antioksidativnega delovanja hidroksitirosole je pokazan na sliki 7. Učinkovitost antioksidantov je večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Pri tem nastali fenoksilni radikal ne sme sprožiti novih radikalnih reakcij, niti se hitro oksidirati (Abram, 2000).

Akumulacija lipidnega peroksilnega radikala je minimalna dokler se vsi antioksidanti ne porabijo za nevtralizacijo radikalov (Huang in sod., 2005).

Znano je, da so *o*-difenoli približno pet- do desetkrat močnejši antioksidanti od mono polifenolov (npr. tirosol, vanilinska kislina, p-kumarna kislina ...) (Butinar in Bučar - Miklavčič, 2000). Sposobnost *o*-difenolnih spojin je tudi vezava kovinskih ionov v kelatne spojine. Vpliv koncentracije antioksidanta na hitrost avtoksidacije je odvisen od mnogih dejavnikov, kot so struktura antioksidanta, pogoji, pri katerih poteka oksidacija, in od narave vzorca. Pogosto fenolne spojine izgubijo svojo antioksidacijsko sposobnost pri izjemno visokih koncentracijah in se začnejo obnašati kot prooksidanti (propagatorji nastajanja prostih radikalov) (Abram in Simčič, 1997).

Zaradi visoke vsebnosti antioksidantov (polifenoli, tokoferoli, β -karoten) in oleinske kisline, ki je enkrat nenasiciena maščobna kislina, je oljčno olje oksidacijsko zelo stabilno v primerjavi z ostalimi olji. Na njegovo stabilnost lahko vplivamo tudi tako, da ga hranimo v ustreznih pogojih, kot sta temen in hladen prostor ter steklena embalaža.



Slika 7: Princip antioksidativnega delovanja hidroksitirosola (Butinar, 1999a).

Fenolne spojine so pomembne pri zaviranju lipidne avtooksidacije v zgodnji fazi. *o*-difenoli podaljšujejo indukcijski čas oksidacije DOO. Na stabilnost DOO nikoli ne vpliva ena sama spojina, ampak je stabilnost odvisna od medsebojnega vpliva prisotnih spojin. Proste maščobne kisline, skvalen, homovanilinska kislina in apigenin zanemarljivo malo vplivajo na oksidacijsko stabilnost oljčnega olja (Mateos in sod., 2003).

Eksperimenti, ki so bili narejeni na ljudeh in živalih, so pokazali, da polifenoli pozitivno vplivajo na človeški organizem. Vzdržujejo pravilno razmerje LDL in HDL lipoproteinov, tako da višajo koncentracijo HDL in manjšajo koncentracijo LDL. Preprečujejo oksidacijo DNA in tako zmanjšajo možnost nastanka raka ter po določenih biokemijskih poteh zmanjšujejo vnetja v telesu, ki so vzrok za številna kronična obolenja in nekatere vrste raka (Cicerale, 2009).

Hidroksitirosol in olevropein imajo močan antioksidativni učinek, saj inhibirata strjevanje krvničk in kopičenje tromboksana v krvi (Butinar in Bučar - Miklavčič, 2000). Poleg tega je bilo z *in vitro* testi dokazano, da imajo polifenoli tudi antimikrobne lastnosti. Te lastnosti pripisujejo dialdehidni oblici dekarboksimetil olevropeinskemu in ligstrozidnemu aglikonu, hidroksitirosolu in tirosolu, ki delujejo proti širokemu spektru mikroorganizmov (Cicerale, 2009).

2.4.4 Analitske metode za določanje antioksidativne učinkovitosti

Antioksidativna učinkovitost, ki smo jo določili z izbrano metodo, je rezultat, ki smo ga dobili pod določenimi eksperimentalnimi pogoji. Rezultate ene metode ne moremo posplošiti na celotno antioksidativno učinkovitost preiskovanega vzorca (Prior in sod., 2005). Na grobo lahko metode za antioksidativno učinkovitost razdelimo na dve kategoriji (Prior in sod., 2005):

- metode, ki temeljijo na prenosu vodikovega atoma (PHA)
- metode, ki temeljijo na prenosu elektrona (PE)

S PHA osnovanimi metodami merimo sposobnost antioksidanta za lovljenjem prostih radikalov z donacijo vodikovega atoma (AH = donor H). Reakcije so neodvisne od pH in vrste topila. Po navadi so hitre, saj trajajo od nekaj sekund do nekaj minut. Prisotnost reducenta (vključno s kovinami) v raztopini lahko privede do napačnih navideznih reaktivnosti.



S PE osnovanimi metodami določimo sposobnost potencialnega antioksidanta za prenos enega elektrona na drugo spojino (kovine, karbonilne spojine, radikali) ter redukcijo le-te. Reaktivnost PE metod temelji na deprotonaciji in ionozacijskem potencialu reaktivne funkcionalne spojine. So pH odvisne, ker z naraščanjem pH pada ionizacijski potencial ter z deprotonacijo narašča kapaciteta prenosa elektrona. Reakcije so počasne in potrebujejo več časa, da potečejo do konca. Prisotnost kovin moti metodo in lahko pripelje do napačnih rezultatov.

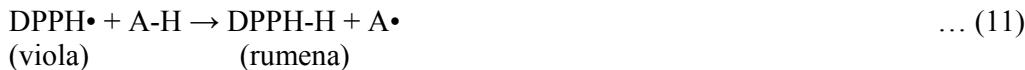
Polifenoli učinkujejo antioksidativno v skladu z obema mehanizmoma, ki skoraj vedno potekata hkrati. Kateri mehanizem prevladuje, je odvisno od strukture antioksidantov in pH raztopine (Prior in sod., 2005).

Najbolj razširjeni testi, ki se uporabljajo za določitev antioksidativne učinkovitosti, temeljijo na merjenju aktivnosti vezave kisika, inhibicije inducirane lipidne avtoksidacije, kelacije kovinskih ionov in moči redukcije. Pri *in vitro* metodah se uporabljajo različni radikali, kot so ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)), DMPD⁺ (*N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin) in DPPH[•] (2,2-difenil-2-pikrilhidrazilni radikal) (Locatelli in sod., 2009).

Obstaja veliko metod za določanje antioksidativne učinkovitosti in vsaka ima svoje omejitve. Dokazano je bilo, da različne metode dajo različne rezultate o antioksidativni učinkovitosti (Gorinstein in sod., 2003).

2.4.4.1 Sposobnost lovљenja radikala DPPH•

Metoda se je že od nekdaj uporabljala za merjenje antioksidativne učinkovitosti v sadnih in zelenjavnih sokovih ter ekstraktih. DPPH[•] je eden izmed redkih stabilnih in komercialno dostopnih organskih dušikovih radikalov. Metoda temelji na reakciji med antioksidantom in stabilnim radikalom DPPH[•]. Sposobnost se lahko določa z elektronsko spinsko resonanco (ESR) ali spektrofotometrično, tako da se meri znižanje absorbance pri 515 nm. Znižanje absorbance je posledica prenosa elektrona ali vodikovega atoma od antioksidanta (A-H) na radikal DPPH[•] (redukcija), kar vodi do spremembe barve iz vijolične v rumeno:



Nastaneta reducirana oblika DPPH-H in prosti radikal ($A\cdot$), katerega reaktivnost je odvisna od strukture molekule. Lahko pa se dva radikala povežeta skupaj in nastane stabilna molekula (Bešter, 2007).

Zmanjšanje absorbance je sorazmerno koncentraciji antioksidantov v vzorcu. Delež preostalega DPPH[•] izrazimo kot:

$$\% \text{ preostalega DPPH}^{\bullet} = [c_{\text{DPPH}(t=x)} / c_{\text{DPPH}(t=0)}] \times 100 \quad \dots (12)$$

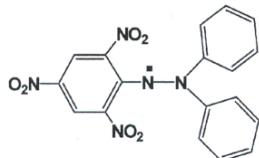
$c_{\text{DPPH}(t=0)}$ – začetna koncentracija radikala DPPH[•]

$c_{\text{DPPH}(t=x)}$ – koncentracija radikala DPPH[•] po t = x min inkubacije

Delež preostalega DPPH[•] radikala je odvisen od koncentracije antioksidantov v raztopini. Koncentracija antioksidantov, ki je potrebna, da pri reakcijskih pogojih zniža začetno koncentracijo DPPH[•] za 50 %, je izražena kot ED_{50} . Čas, ki je potreben, da dosežemo ED_{50} , se izračuna iz kinetične krivulje (odvisnost % preostalega DPPH[•] radikala od časa inkubacije) in je definiran kot T_{ED50} . Uveljavljen je tudi naslednji parameter, ki prikaže učinkovitost nekega antioksidanta in se imenuje protiradikalska zmogljivost (AE), ki jo izračunamo v skladu z naslednjo relacijo:

$$AE = (1/ED_{50}) T_{ED50}. \quad \dots (13)$$

Huang in sod. (2005) v članku navajajo, da je DPPH[•] stabilen radikal, vendar ne kaže podobnosti z visoko reaktivnimi in prehodnimi peroksil radikalami, ki so vključeni v lipidni peroksidaciji v živilu. Veliko antioksidantov, ki hitro reagirajo s peroksilnimi radikalami, lahko reagira počasi oziroma so inertni do DPPH[•] radikala (Prior in sod., 2005). Različni dejavniki, kot so pH, reagenti, topilo, ekstrakcija, koncentracija vzorcev in reakcijski čas, lahko vplivajo na metodo in s tem povzročijo napačne rezultate. Metoda je enako učinkovita, če DPPH[•] radikal raztopimo v organskih topilih, kot sta metanol in etanol, ne moremo pa ga raztopiti v vodi (Locatelli in sod., 2009).



Slika 8: Strukturna formula 2,2-difenil-1-pikrilzil radikala (DPPH[•]) (Prior in sod., 2005)

Veliko eksperimentov je pokazalo, da ni linearne korelacije med koncentracijo antioksidantov in aktivnostjo lovljenja prostih radikalov (Locatelli in sod., 2009). Poleg tega različni viri navajajo, da je delovanje antioksidantov *in vivo* in *in vitro* testih težko primerljivo, ker sintetični in naravno tvorjeni radikalni nastanejo pod različnimi pogoji in se po strukturi razlikujejo.

2.4.4.2 Sposobnost redukcije železovega iona

Metoda neposredno meri redukcijsko sposobnost preiskovanega antioksidanta ter je pomemben parameter pri določanju antioksidativne učinkovitosti spojin (Firuzi in sod., 2005; Wong in sod., 2005). Je hitra in ponovljiva. Uporablja se lahko pri vodnih in alkoholnih ekstraktih. Ob prisotnosti antioksidanta, ki odda elektron, se železovi (III) ioni (Fe^{3+}) reducirajo v železove (II) ione (Fe^{2+}), kar zasledujemo spektrofotometrično pri valovni dolžini 740 nm.

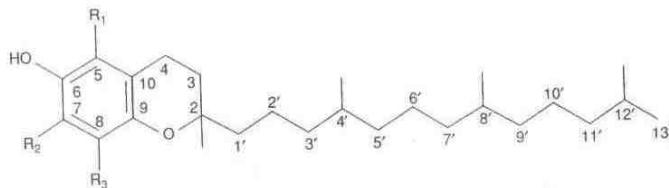
2.5 OSTALE MINORNE SNOVI V OLJČNEM OLJU

Minorne snovi niso triacilglicerolnega izvora in so neumiljive. Poleg fenolnih spojin spadajo sem še ostale spodaj naštete spojine.

2.5.1 Tokoferoli

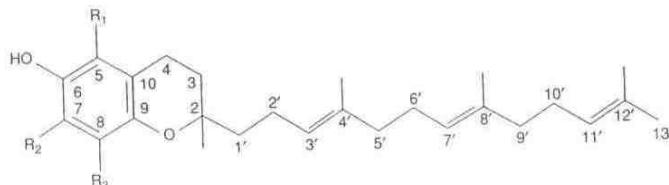
Tokoferoli so pomembne neumiljive spojine, ki poleg fenolnih spojin oljčno olje varujejo pred oksidacijo. Poznanih je osem naravnih substanc, ki jih imenujemo vitamin E. Kemijsko jih delimo na tokotrienole in tokoferole. S skupnim imenom jih imenujemo tokoli (Butinar in sod., 1999c).

Tokoferoli



tokoferoli in tokotrienoli	R ₁	R ₂	R ₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

Tokotrienoli



Slika 9: Struktura tokoferolov in tokotrienolov (Woolard in Indyk, 2003)

Razlikujejo se po položaju in številu metilnih skupin na benzenovem obroču. Ločimo spojine z nasičeno C_{16} izoprenoidno verigo (tokoferoli) ter njim ustrezne spojine z dvojnimi vezmi na položaju C-3', C-7' in C-11' v stranski verigi ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tokotrienoli), kar je tudi prikazano na sliki 9. Vse omenjene spojine so biološko aktivne in izkazujejo lastnosti antioksidantov (*in vitro* in *in vivo*), ki ščitijo nenasičene maščobne kisline pred oksidacijo. V naravi je najbolj razširjen α -tokoferol, ki je tudi glavna aktivna sestavina vitamina E (Rudan - Tasič, 2000).

Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na vsebnost vitamina E v oljčnem olju, je sorta. Vsebnost vitamina je odvisna tudi od klimatskih razmer v času dozorevanja, časa in načina

predelave ter skladiščenja. Olja iz zgodnje obranih in predelanih plodov imajo večjo vsebnost tokoferolov.

Kakovostna olja vsebujejo 100–300 mg/kg tokoferolov. Olja z visoko vsebnostjo prostih maščobnih kislin pa imajo majhno vsebnost tokoferolov. Oljčna olja vsebujejo 5–300 mg/kg celokupnih tokoferolov, od tega približno 95 % α -tokoferola ter 5 % β in γ -tokoferola. δ -tokoferol se pojavlja le v sledeh, 0,02–0,2 mg/100 g olja (Butinar in Bučar - Miklavčič, 2000; Butinar, 2001).

Tokoli so antioksidanti, ki delujejo kot prekinjevalci radikalnih reakcij pri lipidni avtooksidaciji. Glede na njihovo avtooksidacijsko in biološko delovanje jih razvrstimo na naslednji način (Bučar - Miklavčič, 1997):

- antioksidativno učinkovitost: $\delta >> \beta > \gamma > \alpha$
- biološko delovanje: $\alpha >> \beta > \gamma > \delta$

Večja antioksidativna učinkovitost γ - in δ -tokoferola v primerjavi z α -tokoferolom temelji na večji stabilnosti γ - in δ -tokoferola do kisika in produktov avtooksidacije (Vidakovič, 2005).

2.5.2 Steroli

Steroli so po kemični sestavi viskomolekulski ciklični alkoholi. Prisotni so v prosti obliki ali pa zaestreni z maščobnimi kislinami. Najpogostejše vrednosti sterolov v oljčnih oljih so 100–200 mg/100 g, med katerimi so najpomembnejši β -sitosterol, δ -5-avenasterol in kampesterol. Z določanjem koncentracije sterolov se ugotavlja pristnost oljčnega olja (Bučar - Miklavčič, 1997; Vesel in sod., 2009).

2.5.3 Terpenski ogljikovodiki

Skvalen ($C_{30}H_{50}$) je intermediat sinteze rastlinskih sterolov. V DOO je njegova koncentracija 200–7.500 mg/kg olja, ki je odvisna od načina kultivacije oljk in ekstrakcije olja (Tsimidou, 2003; Vesel in sod., 2009).

2.5.4 Voski

Voski so estri maščobnih kislin z maščobnimi alkoholi. EDOO in DOO jih vsebujejo zelo malo, do 250 mg/kg olja, lampante do 300 mg/kg olja (Bučar - Miklavčič, 1997; Uredba komisije (EGS), št. 2568/91, 1991).

2.5.5 Alifatski alkoholi

Najpogostejši alifatski alkoholi v oljčnih oljih so dokozanol, tetrakozanol, heksakozanol in oktakozanol. Skupna vrednost alifatskih alkoholov ne presega 35 mg/100 g olja (Bučar - Miklavčič, 1997).

2.5.6 Aldehydi

Aldehydi so hlapne spojine, ki dajejo oljčnim oljem značilno aroma. Najpomembnejša sta heksanal in 2-heksenal. Nastanejo pri gnetenju plodov. Dajejo značilno aroma zelenih, svežih sadežev. V žarkih oljih pa je zvišana koncentracija heptanala (Bučar - Miklavčič, 1997).

2.5.7 Triterpenski alkoholi

Najbolj zastopana triterpenska dialkohola sta eritrodiol in uvaol, ki sta pretežno v povrhnjici oljčnega ploda in se ju uporablja kot kazalca pristnosti olj oljčnih tropin v EDOO in DOO. Njihov delež glede na skupne sterole je lahko do 4,5 ut. % (Bučar - Miklavčič, 1997; Vesel in sod., 2009).

2.5.8 Pigmenti

Oljčna olja so zeleno do zlato rumeno obarvana, kar je odvisno od sorte in zrelosti plodov. Barvo dajejo klorofil, karotenoidi in feofitin. Vsebnost klorofila in feofitina je 1–20 ppm. Olja iz črnih plodov vsebujejo samo feofitin. V prisotnosti svetlobe klorofil deluje kot močni promotor oksidacije. Višja vsebnost klorofila imajo olja, ki so pridobljena s centrifugiranjem.

Najpogostejsi karotenoidi v oljčnih oljih so β -karotem, lutein, violaksantin in neoksantin. Vsebnost vseh karotenoidov je 1–2 ppm, vsebnost β -karotena pa 0,5–4 ppm (Bučar - Miklavčič, 1997).

3 MATERIALI IN METODE DELA

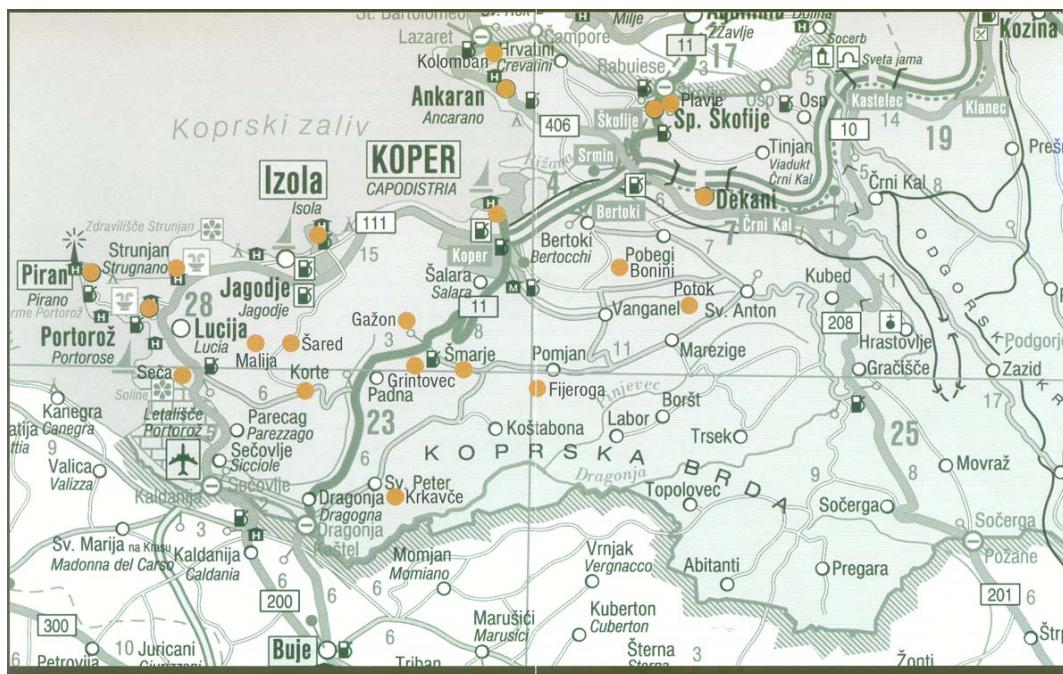
3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorčenje

V raziskavo smo vključili 24 vzorcev OO, 22 jih je izviralo iz Slovenske Istre, 2 pa z otoka Krka (Hrvaška), letnik 2007. Lokacija oljarn (torkel) v Slovenski Istri je prikazana na sliki 10. Vzorci so bili od različnih pridelovalcev, pridobljeni s klasično predelavo s stiskanjem in v kontinuirnem dvoinpolfaznem sistemu. Osem vzorcev je bilo pridobljenih iz sorte 'Istarska belica', sedem iz sorte 'Leccino', dva iz sorte 'Oblica', en iz sorte 'Buga' ter šest iz mešanice več sort ('Istarska belica', 'Leccino', 'Črnica', 'Buga', 'Štorta', 'Mata', 'Komuna'). Zbrani in izbrani so bili v laboratoriju LABS, d. o. o., Inštitut za ekologijo, oljčno olje in kontrolo.

V preglednici 3 so prikazani seznam vzorcev olja, sorta, kislost vzorcev ter vsebnost tokoferolov. Kislost smo podali kot informativno lastnost vzorcev, ki določa kakovostni razred OO (EDOO ima kislost $< 0,8$ ut. %; DOO ima kislost $\geq 0,8$ ut. % in $\leq 2,0$ ut. %). Prevladujejo vzorci iz EDOO. Vsebnost tokoferolov smo podali zato, da smo pokazali stanje olja pred analizo.

Prvi del analize (ekstrakcija fenolnih spojin za HPLC, identifikacija in določitev skupnih fenolnih spojin smo opravili v laboratoriju LABS, d.o.o., v Izoli. Drugi del analize (ekstrakcija fenolnih spojin, določitev skupnih fenolnih spojin z reagentom Folin-Ciocalteu, določitev antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin) smo opravili na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddeleka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.



Slika 10: Območja oljarn v Slovenski Istri (Duštvo Oljkarjev Slovenske Istre, 2006)

Preglednica 3: Oznaka vzorcev, kislost, vsebnost tokoferolov in sorta vzorcev OO

Oznaka OO	Kislost (ut. %)	Vsebnost tokoferolov (mg/kg olja)					Sorta oljke
		alfa	beta	gama	delta	skupno	
OL-289-07	0,15	115	0	0	0	115	BE
OL-290-07	0,88	174	0	8	8	189	BE, BU Č, K
OL-291-07	0,24	160	0	5	0	165	BE
OL-292-07	0,25	111	3	0	0	115	BE
OL-293-07	0,26	145	3	7	0	154	BE
OL-294-07	0,60	232	0	18	9	258	Š, ŽIŽ, L
OL-295-07	0,84	243	3	18	4	268	L
OL-296-07	0,66	207	0	12	0	219	L, BU, BE, Č
OL-297-07	0,16	177	0	7	0	183	BE, BU, Č
OL-298-07	0,24	160	0	4	0	164	BE, K, MATA
OL-382-07	0,11	186	11	17	0	214	L
OL-383-07	0,16	237	10	23	0	270	L
OL-384-07	0,12	210	9	16	0	234	L
OL-385-07	0,13	315	11	23	0	349	OBLICA
OL-386-07	0,50	194	11	20	0	224	OBLICA
OL-387-07	1,56	84	9	16	12	120	BE
OL-388-07	1,81	89	0	0	14	102	BE
OL-389-07	1,31	108	10	14	17	149	BE
OL-390-07	0,12	262	0	25	0	287	L
OL-391-07	0,12	269	10	22	0	302	L
OL-392-07	0,12	274	10	19	0	303	BU
OL-393-07	0,77	170	9	17	0	197	Č, BU
OL-394-07	0,14	114	8	11	0	133	BE
OL-395-07	0,13	221	11	18	0	251	L

Sorte oljk: BE: 'Istrska belica', BU: 'Buga', Č: 'Črnica', K: 'Komuna', Š: 'Štorta', ŽIŽ: 'Žižola', L: 'Leccino', MATA: 'Mata'

3.1.2 Reagenti, pribor in aparature

Pri analizah smo uporabljali naslednje reagente in topila:

- siringinska kislina (Fluka, Švica),
- metanol (analitske čistosti, Sigma Aldrich, Nemčija),
- n-heksan (analitske čistoče, Riedel-de-Haën, Nemčija),
- metanol za preparativno tekočinsko kromatografijo (Riedel-de Haën, Nemčija),
- voda za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- acetonitril (Riedel-de Haën, Nemčija),
- fosforna kislina (98 %),
- metanol (analitske čistosti, Merck, Nemčija),
- n-heksan (analitske čistosti, Merck, Nemčija),
- reagent Folin-Ciocalteu (Fluka, Švica),
- natrijev karbonat (analitske čistosti, Alkaloid, Makedonija),
- DPPH• (Sigma, Nemčija),
- etanol (96 %, Merck, Nemčija),
- kalijev dihidrogenofosfat (V) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška),

- kalijev heksacianoferat (II) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška),
- dinatrijev hidrogenfosfat (V) (analitske čistosti, Zorka, Šabac, Srbija),
- triklorocetna kislina (čistost 99,5 %, Merck, Nemčija),
- železov klorid (III) (čistost > 99,5 %, Erba Reagenti, Italija),
- železov klorid (II) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška).

Za pripravo raztopin smo uporabljali bdestilirano vodo.

Uporabili smo naslednje aparature in pribor:

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- magnetno mešalo (IKA® RH basic KT/c, Nemčija),
- mikropipeta Finnpipette 100–1000 µl (Thermo Labsystems, ZDA),
- filtri Nylon 66 Membranes (0.2 µm × 47 mm) (Supelco, ZDA),
- analitska tehnicka (Mettler Toldo AT201, Švica),
- stresalnik (Vortex Genie 2: scientific Industries, ZDA),
- rotavapor (HEIDOLPH 2000: Nemčija),
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica),
- HPLC sistem HP1100 Agilent, ki ga sestavljajo naslednje enote:
 - avtomatski termostatiran vzorčevalnik iz tekoče faze: ALS G1329A,
 - razplinjevalec: G 1379A,
 - binarna črpalka: G 1312A,
 - predkolona: RP 4 × 4,6 mm × 5 µm, KJO-4282, Phenomenex, ZDA,
 - kolona: Luna RP C18(2): 250 × 4.6 mm × 5 µm, Phenomenex, ZDA,
 - detektor: Multiwavelenght UV-VIS, G1365B,
- štoparica,
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike),
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija),
- viale (2 mL, Crimp viala),
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija).

3.2 NAČRT IN METODE DELA

3.1.3 Načrt

Po izboru 24 vzorcev oljčnega olja, ki so izvirali iz Slovenske Istre in otoka Krka, smo opravili ekstrakcijo fenolnih spojin.

V pridobljenih ekstraktih smo izvedli naslednje analize:

- identifikacijo in določitev vsebnosti posameznih fenolnih spojin z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC),
- spektrofotometrično določitev skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim reagentom,
- določitev antioksidativne učinkovitosti z naslednjimi analiznimi metodami:
 - določitev sposobnosti lovljenja stabilnega prostega radikala DDPH•
 - določitev sposobnosti redukcije iona Fe³⁺ v ion Fe²⁺.

3.1.4 Metode dela

3.1.4.1 Ekstrakcija fenolnih spojin iz olja za analizo s HPLC

Fenolne spojine smo iz oljčnega olja ekstrahirali po metodi Gutfinger (1981). V 50 mL plastično centrifugirko smo odtehtali 5,0 g olja, dodali 2,5 mL internega standarda siringinske kisline s koncentracijo 0,0153 mg/mL ter raztopili s pomočjo 25 mL heksana. Raztopino smo prenesli v 100 mL lij ločnik, dodali 10 mL 60 % metanola (MetOH : H₂O 60 : 40, m/m) in ročno stresali 2 minuti. Po stresanju smo pustili stati nekaj minut, da se različno polarni fazi ločita in spodnjo fazo (metanolno) odlili v 100 mL čašo ter dvakrat nadomestili s svežim ekstrakcijskim topilom. Ekstrakte smo združili in odparili ekstrakcijsko topilo na rotavaporju pri 40 °C in hitrosti vrtenja 150 obratov na minuto. Suhi ekstrakt v bučki smo raztopili z 1 mL metanola. Raztopino smo z mikropipeto prenesli v 2 mL vialo ter jo do nadaljnje analize (v roku 24 ur) hranili v zamrzovalniku.

3.1.4.2 Priprava internega standarda s siringinsko kislino

Interni standard smo dodali v vzorec, da smo lahko ocenili morebitne izgube fenolnih spojin pri ekstrakciji. Izguba fenolov je sorazmerna z izgubo internega standarda, katerega količina v vzorcu je poznana.

Priprava raztopine siringinske kisline (osnovna raztopina)

V 10 mL bučko smo odtehtali 0,0153 g siringinske kisline ter z 80 % metanolom (MetOH: H₂O 80 : 20, V/V) dopolnili do oznake. Zatem smo v 100 mL bučko z merilno pipeto prenesli 1 mL osnovne raztopine siringinske kisline in z 80 % metanolom (MetOH: H₂O 80 : 20, m/m) dopolnili do oznake ter tako pripravili raztopino s koncentracijo 0,0153 mg/mL.

3.1.4.3 Določitev posameznih in skupnih fenolnih spojin v raztopini s HPLC

Metoda je prirejena po metodi Cortesi in sod. (2002). Separacija fenolnih spojin je potekala na koloni Luna RP-C18, 250 × 4.6 mm, velikost delcev 5 µm. Uporabili smo RP predkolono 4 × 4,6 mm, velikost delcev 5 µm. Pripravili smo dve polarni mobilni fazi A in B.

Mobilna faza A (MF A) je bila raztopina fosforne kisline (1000 mL vode za HPLC in 2 mL 98 % fosforne kisline). Mobilna faza B (MF B) je bila mešanica acetonitrila in metanola (1 : 1, V/V). Obe mobilni fazi smo filtrirali prek 0,2-µm filtra. Za analizo enega vzorca z injekcijskim volumnom 10 µL smo pri pretoku mobilne faze 1,32 mL/min, temperaturi injektorja in kolone 15 °C porabili 82 minut. Sestava mobilne faze se je spremenjala po nastavljenem programu. Na začetku analize je bila mobilna faza sestavljena iz 96 % MF A in 4 % MF B. Po 40 minutah analize se je delež MF A znižal na 50 %, po 45 minutah na 45 % in po 60 minutah analize na 0 %. Nadalnjih 10 minut je bil delež MF B 100 %, nato pa se je po 2 minutah znižal na 4 % glede na začetek analize. Fenolne spojine smo določali pri 280 nm, luteolin in apigenin pa pri 340 nm.

3.1.4.4 Ekstrakcija fenolnih spojin iz olja za določanje skupnih fenolnih spojin in antioksidativne učinkovitosti

10 g olja smo raztopili s 50 mL heksana, raztopino prelili v 100 mL lij ločnik, s pipeto dodali 20 mL 80 % metanola (MetOH : H₂O, 80 : 20, m/m) in vse skupaj stresali 4 minute. Po stresanju smo pustili, da se polarna in nepolarna faza ločita ter spodnjo (polarno) fazo odlili v 250 mL čašo ter ekstrakcijo še dvakrat ponovili, tako da je končni volumen znašal 60 mL. Da bi pridobili večjo količino ekstrakta, smo opisani postopek ponovili od dva do štirikrat. Ekstrakte smo združili in ekstrakcijsko topilo odparili na rotavaporju pri 40 °C pri srednji hitrosti vrtenja. Suhi ekstrakt smo raztopili z 2,5 mL metanola in raztopino prenesli s pomočjo 1000 µL mikropipete v 10 mL centrifugirko in jo do nadaljnje spektrofotometrične analize hranili v hladilniku. Vzorec OL-295-07 smo raztopili z 2 mL metanola, vzorca OL-294-07, OL-387-07 smo raztopili s 3 mL metanola.

3.1.4.5 Kvantitativno določanje fenolnih spojin z reagentom Folin-Ciocalteu

Fenolne spojine smo kvantitativno določili po metodi Gutfinger (1981). Ekstrakt vzorca smo najprej razredčili z metanolom. Razredčitev je bila odvisna od koncentracije fenolnih spojin v posameznem vzorcu oziroma ekstraktu. Za pomoč pri razredčitvah smo uporabili podatke s koncentracijami fenolnih spojin v vzorcih, ki smo jih dobili s HPLC analizo.

Po ustrezni razredčitvi smo z mikropipeto prenesli 25 µL razredčenega ekstrakta v dve 1,5 mL centrifugirki in dodali 175 µL metanola, tako da smo imeli dve paralelni z 200 µL metanolne raztopine fenolnih spojin. V vsako paralelko smo dodali še 125 µL reagenta Folin-Ciocalteu (F-C : H₂O, 1 : 2, V/V), 125 µL nasičene raztopine natrijevega karbonata in 550 µL destilirane vode. Nastalemu obarvanemu kompleksu smo po 40 min z UV-spektrofotometrom izmerili absorbanco. Merili smo v 1,5 mL kivetih pri 765 nm valovni dolžini. Če so bile raztopine motne, smo jih centrifugirali 6 minut pri 13000 obratih min⁻¹. Poleg vzorcev smo pripravili tudi slepi vzorec, kjer smo namesto metanolne raztopine fenolnih spojin odmerili 200 µL destilirane vode. Vsebnost sFS smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili na osnovi galne kisline.

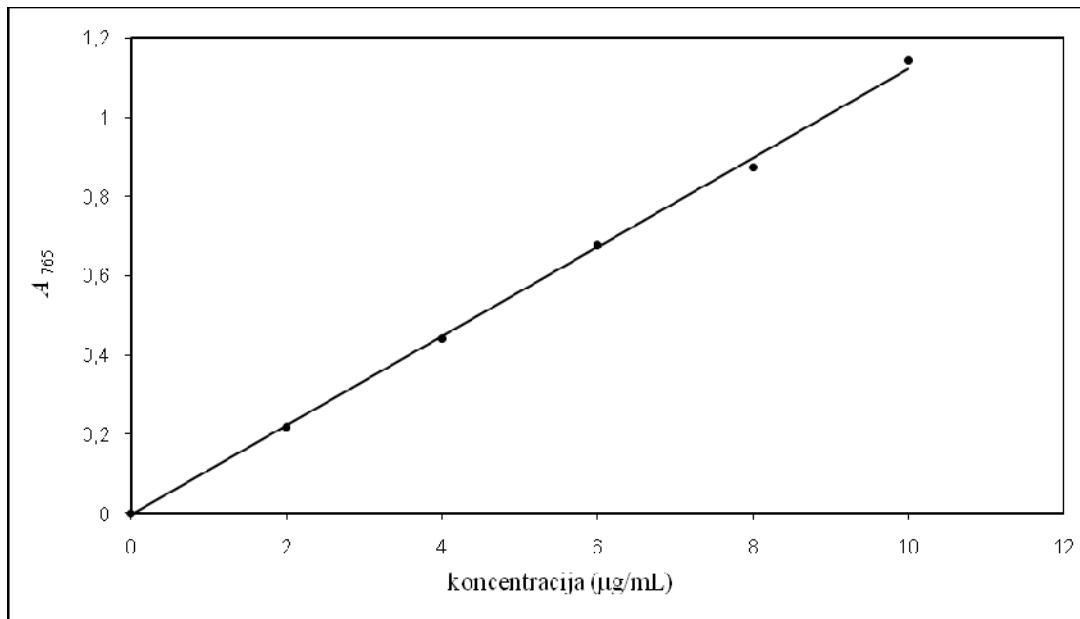
3.1.4.6 Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 25 mL bučko smo odtehtali 10 mg galne kisline, dopolnili do oznake z destilirano vodo in tako pripravili osnovno raztopino galne kisline z masno koncentracijo ($\gamma_{g.k.}$) 400 µg/mL. V epice smo odmerili različne volumne osnovne raztopine ter v skladu s F-C metodo izmerili absorbanco pri 765 nm. V preglednici 4 so prikazane vrednosti za volumne osnovne raztopine, ki smo jih odmerili v reakcijsko mešanico, $\gamma_{g.k}$ v reakcijski mešanici in vrednosti izmerjene absorbance.

Preglednica 4: Volumen osnovne raztopine (V), masna koncentracija galne kisline ($\gamma_{g.k}$) v reakcijski mešanici ter vrednosti izmerjene absorbance (A_{765})

V [μL]	$\gamma_{g.k}$ [μg/mL]	A_{765}
5	2	0,2174
10	4	0,4415
15	6	0,6763
20	8	0,8731
25	10	1,1426

Iz masne koncentracije in izmerjene absorbance galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 11. Z linearno regresijsko analizo smo izračunali koeficient premice (k). Vrednost k je $(0,1121 \pm 0,0011)$ $(\mu\text{g/mL})^{-1}$, ($r = 0,9994$).



Slika 11: Umeritvena krivulja z galno kislino

Masno koncentracijo sFS (γ_{FS}) v reakcijski mešanici smo izračunali iz zvezze:

$$\gamma_{FS} = \frac{A_{765}}{k} \quad \dots (14)$$

Vsebnost sFS v OO smo izračunali iz masne koncentracije sFS v reakcijski mešanici in mase oljčnega olja ter jo izrazili kot mg galne kisline na kg oljčnega olja.

3.1.4.7 Določitev antioksidativne učinkovitosti ekstrakta fenolnih spojin z metodo DPPH•

Priprava 0,1 mM raztopine DPPH•

Na plastično ladjico smo odtehtali 1,97 mg DPPH•, ga raztopili s 5 mL 96 % etanola, prelimili v 15 mL centrifugirko ter premešali, da se je DPPH• dobro raztopil. Nastalo raztopino smo desetkrat razredčili v 50 mL centrifugirki, tako da smo odvzeli 4 mL raztopine in dodali 36 mL 96 % etanola.

Merjenje absorbance kontrole

V 2,5 mL kiveto smo odmerili 2,9 mL 0,1 mM raztopine DPPH• in 0,1 mL 96 % etanola ter izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Za slepi vzorec smo uporabili 96 % etanol.

Merjenje absorbance ekstraktov

V kiveto smo z mikropipeto odmerili 2,9 mL 0,1 mM raztopine DPPH•, 96 % etanola in ekstrakt polifenolov, tako da je bil skupni volumen v kiveti 3 mL (volumni etanola in ekstrakta so bili različni, celotni volumen pa je znašal 0,1 mL). V trenutku, ko smo dodali ekstrakt, smo začeli meriti absorbanco pri 517 nm. Zniževanje absorbance, ki je posledica spremembe barve iz purpurne v rumeno, smo merili vsakih 30 sekund, od t = 0 do t = 1800 s. Za slepi vzorec smo uporabili 96 % etanol. Volumne ekstrakta, ki smo jih odmerili, so bili odvisni od koncentracije polifenolov v ekstraktu.

3.1.4.8 Določitev antioksidativne učinkovitosti ekstrakta fenolnih spojin z metodo redukcije železovega iona

V plastično epruveto smo z mikropipeto odpipetirali 0,5 mL ustrezno razredčene metanolne raztopine ekstrakta vzorcev. Dodali smo 2,5 mL fosfatnega pufra (pH 6,8), 2,5 mL raztopine kalijevega heksacianoferata (III) in 2,5 mL triklorooacetne kisline ter dobro premešali. Odvzeli smo 2,5 mL raztopine in prenesli v novo epruveto, dodali 2,5 mL destilirane vode, 1 mL raztopine železovega klorida in premešali. Po 25 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm. Pripravili smo tudi slepi vzorec, kjer smo namesto 0,5 mL raztopine ekstrakta odmerili 0,5 mL čistega metanola, ostalega dela postopka in volumnov reagentov nismo spremajali.

Priprava reagentov

Priprava raztopine železovega klorida (FeCl_3): odtehtali 0,5 g FeCl_3 , kvantitativno prenesli v 50 mL bučko ter z destilirano vodo dopolnili do oznake.

Priprava raztopine triklorooacetne kisline ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$): odtehtali 20 g $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$, kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

Priprava raztopine kalijevega heksacianoferata ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$): odtehtali 1 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, kvantitativno prenesli v 100 mL bučko ter z destilirano vodo dopolnili do oznake.

Priprava fosfatnega pufra: (pH 6,8); odtehtali 3,38 g kalijevega kalijevdihidrogenofosfata (V) (KH_2PO_4) in 3,53 g dinatrijevega hidrogenfosfata (V) (Na_2HPO_4) ter raztopili v 1000 mL destilirane vode.

3.1.4.9 Statistična analiza

Povprečne vrednosti meritev znotraj določene metode smo izračunali v skladu z naslednjo enačbo (Košmelj, 2001):

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \quad \dots (15)$$

kjer je:

\bar{x} – povprečna vrednost

n – število vzorcev,

x_i – vrednosti i-te meritve.

Standardni odklon smo izračunali v skladu z naslednjo enačbo (Košmelj, 2001):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots (16)$$

SD = standardni odklon

V poizkusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) z multiplo analizo variance – postopkom GLM (General Linear Models).

Za testiranje razlik med sortami oljk smo uporabili naslednji model:

$$Y_{ijk} = \mu + S_j + e_{ij} \quad \dots (17)$$

y_{ij} = ijk-to opazovanje

μ = povprečna vrednost

S_i = vpliv sorte oljk

e_{ij} = ostanek.

Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanova testa in primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti (r) med merjenimi parametri so bili izračunani s postopkom PROC CORR (SAS Software, 1999).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

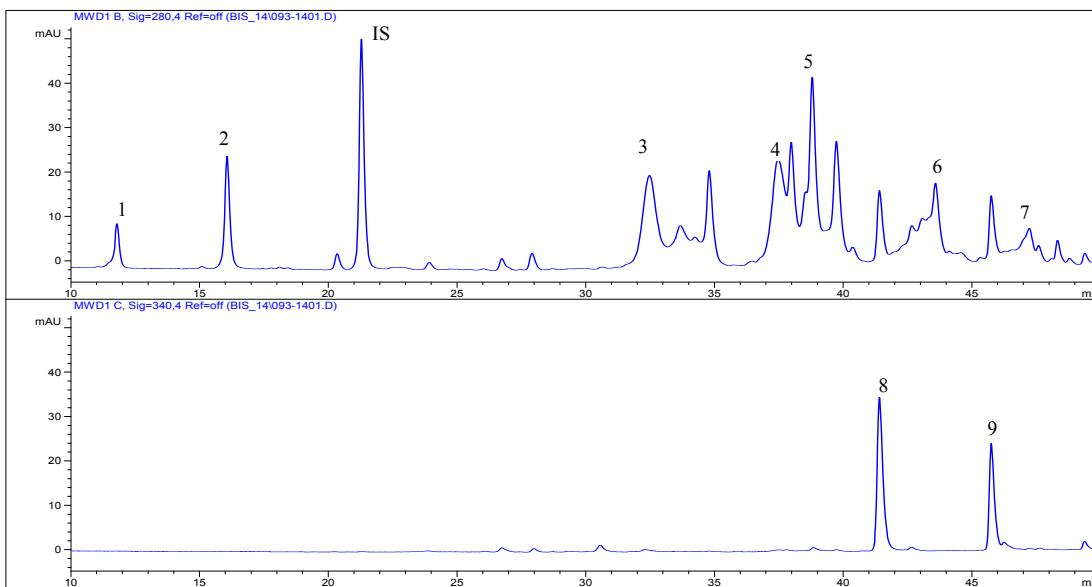
4.1 DOLOČANJE POSAMEZNIH IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

4.1.1 Vsebnost posameznih in skupnih FS (metoda HPLC)

Ekstrakte FS smo pripravili z uporabo topila 60 % metanola (v/v), v vzorec pa smo predhodno dodali interni standard, siringinsko kislino, s katerim smo ocenili morebitne izgube med pripravo ekstrakta.

Pri HPLC analizi smo uporabili standardne spojine TyrOH, Tyr, luteolin in apigenin, s katerimi smo pripravili umeritvene krivulje. Za spojine, pri katerih nismo imeli na razpolago standardnih spojin, smo predpostavili, da imajo enak odziv kot Tyr.

Določili smo devet znanih FS. Sedem FS, TyrOH, Tyr, DMO-Agl-dA, DML-Agl-dA, Lignani, O-Agl-A, L-Agl-A, smo merili pri 280 nm, dve FS, luteolin in apigenin, pa pri 340 nm. Dobili smo kromatograme z dvema različnima valovnima dolžinama (280 nm in 340 nm), iz katerih smo izračunali koncentracije posameznih in sFS, ki so prikazane v preglednici 5. Dva primera kromatograma sta prikazana na sliki 12.



Slika 12: HPLC kromatogram s fenolnimi spojinami v ekstraktu oljčnega olja OL-297-07 (mešane sorte). Spojine so sledeče; 1: TyrOH, 2: Tyr, 3: DMO-Agl-dA, 4: DML-Agl-dA, 5: lignani, 6: O-Agl-A, 7: L-Agl-A (merjeno pri 280 nm), flavonoidi: 8: luteolin, 9: apigenin (merjeno pri 340 nm), IS je interni standard.

Retencijski čas je odvisen od polarnosti FS. Bolj kot je spojina polarna, manjši retencijski čas bo imela. Kot je razvidno iz kromatograma, sta najbolj polarna hidroksitirosol (zaradi dvojne OH skupine) in tirosol. Večje retencijske čase imajo spojine 3, 4, 5, 6, 7 in 8, 9.

V preglednici 5, kjer so rezultati HPLC analize, vidimo, da je največ sFS vseboval vzorec OL-293-07 (EDOO, BE) z vsebnostjo 628 ± 29 mg/kg. Sledita mu vzorca OL-390-07

(EDOO, L) s 582 ± 0 mg/kg in OL-394-07 (EDOO, BE) s 557 ± 9 mg/kg. Vsi trije so osenčeni v preglednici 5. Najmanj sFS sta vsebovala vzorca OL-295-07 (DOO, L) in OL-387-07 (DOO, BE) z vsebnostjo 90 ± 1 mg/kg.

Na vsebnost FS naj bi vplivala tudi sorta oljk. Vsebnost FS v OO pa je pomemben dejavnik pri ocenjevanju kakovosti OO. EDOO vsebujejo veliko FS, kar naj bi veljalo tudi za njihove ekstrakte (Butinar in Bučar - Miklavčič, 2000).

Kot je razvidno iz preglednice 5, ki podaja tudi vsebnosti posameznih FS, je med vsemi preiskovanimi vzorci vseboval največ TyrOH vzorec OL-389-07 ($35,93 \pm 0,04$ mg/kg), največ Tyr pa vzorec OL-298-07 ($51,74 \pm 0,37$ mg/kg). Vzorec OL-390-07 je glede na preostale vzorce vseboval največ DMO-Agl-dA ($224,1 \pm 1,4$), DML-Agl-dA ($149,2 \pm 1,4$ mg/kg), luteolina ($6,77 \pm 0,08$ mg/kg) in asigniranih FS (419 ± 3 mg/kg).

Vzorec OL-394-07 je vseboval največ lignanov ($67,3 \pm 2,0$ mg/kg), vzorec OL-385-07 največ O-Agl-A ($36,8 \pm 4,2$ mg/kg), vzorec OL-388-07 največ L-Agl-A ($24,9 \pm 0,2$ mg/kg) ter vzorec OL-394-07 največ apigenina ($3,17 \pm 0,002$ mg/kg) in neasigniranih FS (318 ± 3 mg/kg).

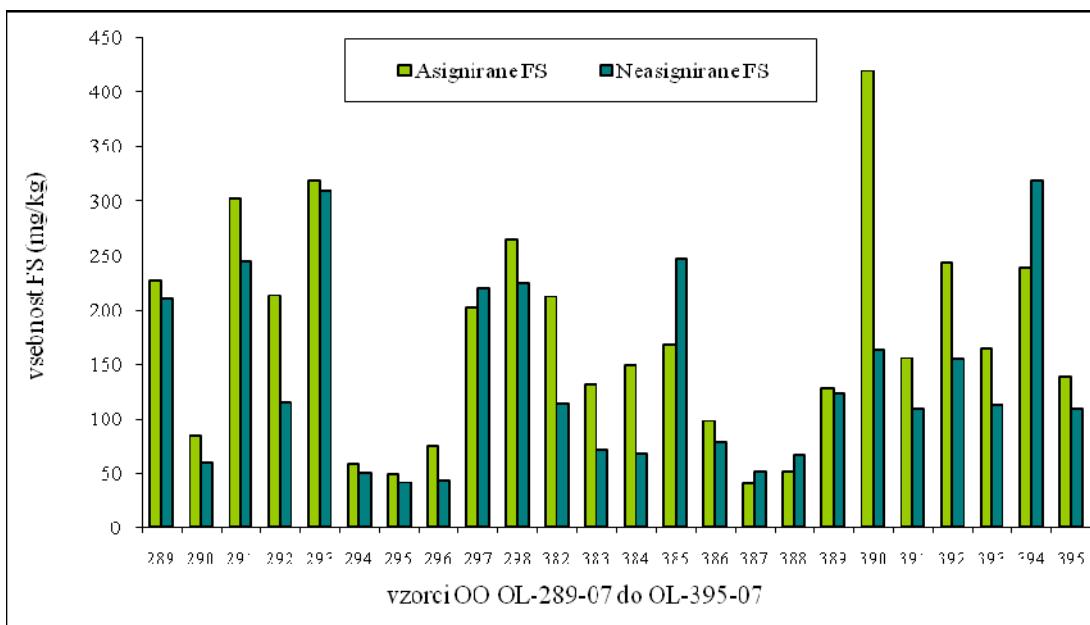
Pri rezultatih lahko upoštevamo, da se fenoli, ki so dobro topni v vodi in imajo manjšo molekulsko maso, zgubijo med predelavo OO, medtem ko FS z večjo molekulsko maso preidejo v olje in se lahko ekstrahirajo z metanolom (Papadopoulos in sod., 2003).

V preglednici 5 in na sliki 13 so prikazane vsebnosti asigniranih (znanih) in neasigniranih (neznanih) FS. V določenih vzorcih je razmerje med neasigniranimi in asigniranimi FS precej veliko, v vzorcih (OL-297-07, OL-385-07, OL-387-07, OL-388-07, OL394-07) celo prevladujejo neasignirane FS.

Glede na to, da smo ekstraktom določali AU, je poudarek na vzorcih, ki so vsebovali največ oziroma zelo malo posameznih in sFS. Tako smo lahko dobili ustrezno primerjavo, ali je AU odvisna od vsebnosti posameznih oziroma sFS in od sorte. Ker so bili vzorci različnih kakovosti (EDOO in DOO), smo kakovost (kislota) omenili le, če je bilo to potrebno poudariti pri primerjavi. S pomočjo kislosti smo lahko predvidevali, v kakšnem stanju je bilo OO pred ekstrakcijo.

Preglednica 5: Vsebnost fenolnih spojin (določeno s HPLC in izraženo kot mg/kg oljčnega olja) v preiskovanih vzorcih OO

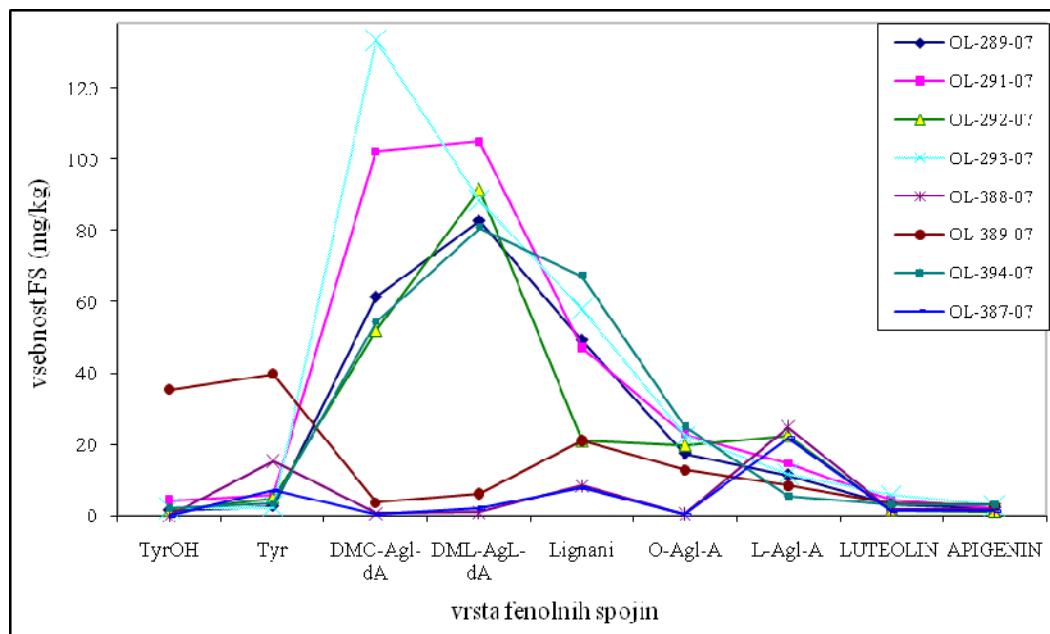
Vzorec OO	280 nm								340 nm			
	TyrOH (mg/kg)	Tyr (mg/kg)	DMO-Agl-dA (mg/kg)	DML-Agl-dA (mg/kg)	Lignani (mg/kg)	O-Agl-A (mg/kg)	L-Agl-A (mg/kg)	LUTEOLIN (mg/kg)	APIGENIN (mg/kg)	Asignirane fenolne spobine (mg/kg)	Neasignirane fenolne spobine (mg/kg)	sFS (mg/kg)
OL-289-07	1,58 ± 0,09	2,70 ± 0,09	61,3 ± 0,9	82,7 ± 1,2	49,2 ± 1,4	17,5 ± 1,2	11,3 ± 1,1	3,41 ± 0,03	2,36 ± 0,03	226 ± 5	209 ± 9	436 ± 14
OL-290-07	0,76 ± 0,01	2,05 ± 0,01	21,7 ± 1,0	31,5 ± 1,1	7,1 ± 0,5	1,9 ± 0,1	19,4 ± 0,5	0,55 ± 0,01	0,46 ± 0,01	84 ± 3	59 ± 26	143 ± 29
OL-291-07	4,38 ± 0,03	5,82 ± 0,06	102,1 ± 0,3	104,9 ± 2,8	47,1 ± 0,0	22,8 ± 1,8	14,6 ± 1,8	4,42 ± 0,13	2,20 ± 0,02	302 ± 6	243 ± 13	545 ± 19
OL-292-07	1,52 ± 0,02	5,09 ± 0,06	52,0 ± 0,5	91,4 ± 1,0	21,0 ± 1,0	19,7 ± 0,6	22,5 ± 2,3	1,75 ± 0,01	1,25 ± 0,03	213 ± 1	114 ± 6	327 ± 7
OL-293-07	2,18 ± 0,06	2,80 ± 0,06	133,3 ± 4,9	88,3 ± 4,4	57,9 ± 2,0	22,3 ± 2,9	11,7 ± 1,8	5,70 ± 0,01	2,96 ± 0,01	319 ± 3	310 ± 27	628 ± 29
OL-294-07	0,00 ± 0,00	13,13 ± 0,24	0,8 ± 0,2	24,5 ± 1,5	5,2 ± 0,4	0,7 ± 0,2	13,1 ± 2,9	0,44 ± 0,03	0,29 ± 0,03	57 ± 1	50 ± 6	107 ± 4
OL-295-07	0,00 ± 0,00	11,91 ± 0,34	0,5 ± 0,1	24,0 ± 0,6	3,2 ± 1,0	0,7 ± 0,2	8,5 ± 0,5	0,30 ± 0,04	0,21 ± 0,01	49 ± 1	41 ± 5	90 ± 1
OL-296-07	1,29 ± 0,14	2,18 ± 0,11	22,8 ± 0,4	31,3 ± 1,0	5,3 ± 0,5	2,5 ± 0,2	9,3 ± 2,0	0,61 ± 0,04	0,42 ± 0,03	75 ± 3	43 ± 5	118 ± 0
OL-297-07	7,33 ± 0,48	19,52 ± 0,06	44,8 ± 0,5	42,7 ± 0,8	58,1 ± 2,0	23,0 ± 4,1	6,7 ± 2,0	4,13 ± 0,55	2,00 ± 0,26	202 ± 4	220 ± 2	422 ± 2
OL-298-07	31,53 ± 2,45	51,74 ± 0,37	51,9 ± 0,1	48,7 ± 0,8	47,6 ± 0,1	22,7 ± 0,2	10,0 ± 0,8	5,91 ± 0,02	2,75 ± 0,01	264 ± 5	224 ± 3	488 ± 2
OL-382-07	31,79 ± 0,11	30,69 ± 0,06	46,4 ± 0,1	51,7 ± 0,0	34,4 ± 2,7	10,5 ± 0,3	6,5 ± 0,4	3,45 ± 0,01	1,42 ± 0,01	212 ± 3	113 ± 6	325 ± 3
OL-383-07	1,92 ± 0,01	3,69 ± 0,04	53,7 ± 0,2	44,5 ± 0,1	13,2 ± 0,0	4,4 ± 0,1	9,0 ± 0,1	4,07 ± 0,01	1,37 ± 0,02	130 ± 1	71 ± 1	201 ± 1
OL-384-07	1,41 ± 0,01	4,77 ± 0,01	63,3 ± 0,0	49,0 ± 0,2	19,6 ± 1,4	5,7 ± 0,2	5,1 ± 0,0	2,83 ± 0,01	1,26 ± 0,00	149 ± 1	68 ± 3	216 ± 2
OL-385-07	7,12 ± 0,95	4,94 ± 0,01	70,5 ± 0,2	17,1 ± 0,5	21,6 ± 2,2	36,8 ± 4,2	9,4 ± 0,6	2,69 ± 0,01	1,63 ± 0,02	167 ± 4	246 ± 13	414 ± 9
OL-386-07	13,11 ± 0,02	10,26 ± 0,02	36,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0	4,9 ± 0,0	23,4 ± 0,1	8,7 ± 0,1	0,34 ± 0,01	0,28 ± 0,00	98 ± 0	77 ± 0	175 ± 1
OL-387-07	0,00 ± 0,00	7,13 ± 0,03	0,4 ± 0,0	2,2 ± 0,1	7,8 ± 0,2	0,4 ± 0,0	21,8 ± 0,4	1,23 ± 0,01	1,47 ± 0,00	40 ± 1	51 ± 1	90 ± 1
OL-388-07	0,00 ± 0,00	15,24 ± 0,21	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,2	8,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	24,9 ± 0,2	1,83 ± 0,01	1,55 ± 0,01	51 ± 1	67 ± 2	117 ± 2
OL-389-07	35,39 ± 0,04	39,73 ± 0,05	3,6 ± 0,2	6,1 ± 0,3	21,0 ± 1,5	12,8 ± 1,4	8,4 ± 0,8	3,36 ± 0,25	2,98 ± 0,30	127 ± 1	123 ± 5	250 ± 4
OL-390-07	1,58 ± 0,25	2,09 ± 0,01	224,1 ± 1,4	149,2 ± 1,3	22,0 ± 2,0	10,1 ± 1,8	10,1 ± 0,2	6,77 ± 0,08	2,01 ± 0,01	419 ± 3	163 ± 2	582 ± 0
OL-391-07	1,67 ± 0,05	2,23 ± 0,01	75,6 ± 0,1	46,5 ± 0,5	10,8 ± 0,1	9,0 ± 0,9	9,3 ± 0,1	2,96 ± 0,06	1,85 ± 0,02	155 ± 1	108 ± 1	264 ± 0
OL-392-07	4,51 ± 0,04	6,42 ± 0,01	110,3 ± 0,0	77,3 ± 1,3	17,1 ± 0,3	21,2 ± 1,4	5,7 ± 0,3	2,96 ± 0,01	1,62 ± 0,00	243 ± 1	154 ± 1	397 ± 0
OL-393-07	6,72 ± 0,02	7,20 ± 0,00	64,3 ± 0,0	35,7 ± 0,0	23,3 ± 0,1	9,0 ± 0,9	17,8 ± 0,1	2,69 ± 0,03	1,08 ± 0,00	164 ± 1	112 ± 3	276 ± 2
OL-394-07	2,08 ± 0,02	3,33 ± 0,22	54,5 ± 1,7	80,8 ± 1,6	67,3 ± 2,0	25,1 ± 0,2	5,4 ± 1,0	3,25 ± 0,01	3,17 ± 0,02	239 ± 6	318 ± 3	557 ± 9
OL-395-07	1,17 ± 0,10	2,54 ± 0,04	46,3 ± 1,0	46,9 ± 0,4	25,3 ± 1,3	8,1 ± 0,1	8,0 ± 2,0	2,45 ± 0,07	1,77 ± 0,02	138 ± 5	109 ± 4	247 ± 0



Slika 13: Vsebnost znanih in neznanih fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja

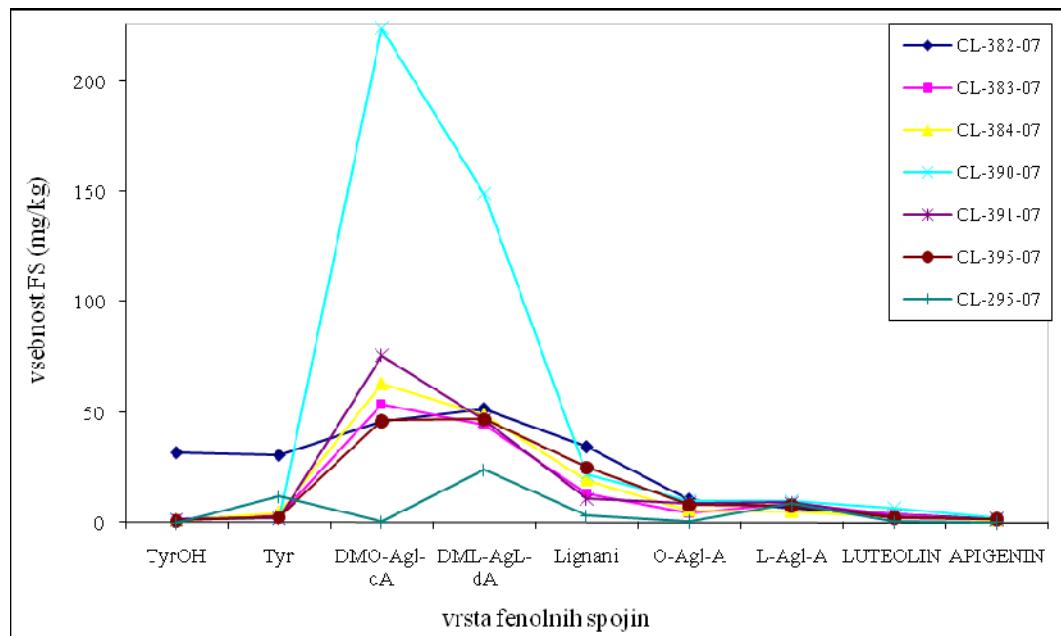
Na slikah 14, 15 in 16 so za preiskovane sorte prikazane vsebnosti posameznih FS v vzorcih, ki smo jih izrazili kot maso FS v mg na kg OO.

Na sliki 14, kjer je za osem vzorcev sorte 'Itrska belica' prikazana vsebnost posameznih FS, vidimo, da imajo le-ti podobno vsebnost posameznih FS. Trije vzorci (OL-389-07, OL-388-07, OL-387-07) se razlikujejo od ostalih vzorcev po vsebnosti FS. Vzorca OL-387-07, -388-07 imata podobna razmerja med FS (veliko L-Agl-A, lignanov in nekaj Tyr). Vzorec OL-389-07 v primerjavi z ostalimi vsebuje največ Tyr, Tyr-OH. Vsebuje tudi razmeroma veliko lignanov, O-Agl-A in L-Agl-A in malo ostalih FS.



Slika 14: Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja sorte 'Istarska belica'

Slika 15 prikazuje vsebnosti posameznih FS za sedem vzorcev sorte 'Leccino'. Najbolj izstopa vzorec OL-390-07, ki med vsemi preiskovanimi vzorci vsebuje največ DMO-Agl-dA. Ostali vzorci imajo podobno vsebnost FS, izstopa le vzorec OL-382-07, ki glede na ostale vzorce olja sorte 'Leccino' vsebuje največ TyrOH in Tyr. Po sestavi FS vsebuje največ DML-Agl-dA ter veliko DMO-Agl-dA in lignanov. Vsi vzorci vsebujejo malo O-Agl-A in L-Agl-A ter razmeroma veliko DMO-Agl-dA, razen vzorca OL-295-07, ki takorekoč DMO-Agl-dA ne vsebuje. Vzoreci vsebujejo tudi malo luteolina in apigenina.

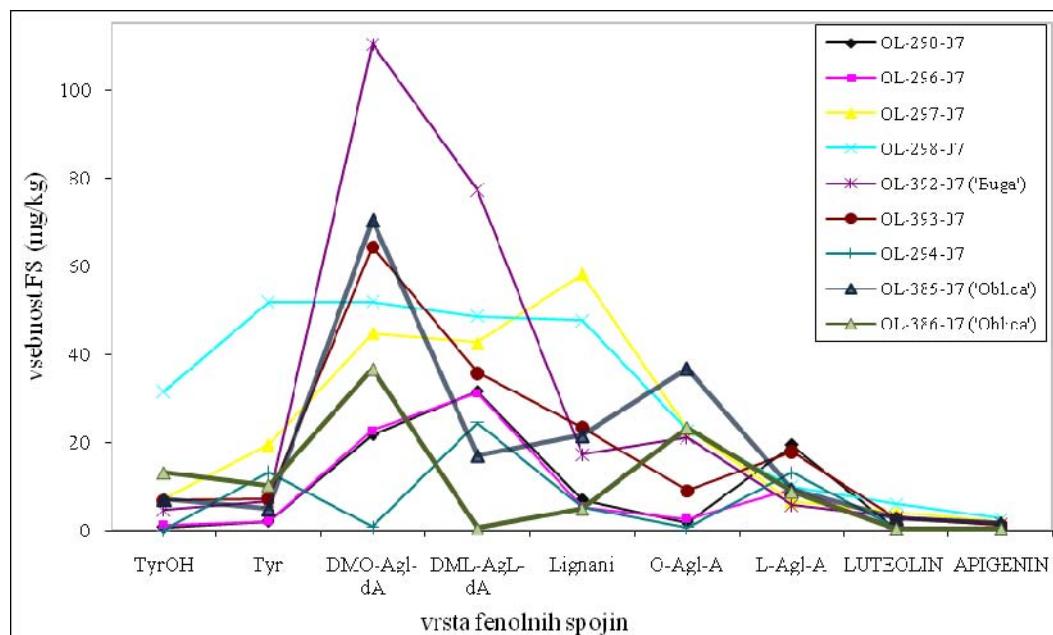


Slika 15: Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja sorte 'Leccino'

Na sliki 16 so za različne vzorce OO (dva sorte 'Oblica', eden sorte 'Buga', šest mešanih sort) prikazane vsebnosti posameznih FS. Vidimo lahko, da se olja iz te skupine med seboj po vsebnosti posameznih FS precej razlikujejo.

Vzorca OL-296-07 in OL-290-07 imata podobno sestavo FS, kjer prevladuje fenolna spojina DML-Agl-dA. Glede na ostale vzorce na sliki 16 vzorec olja OL-392-07 sorte 'Buga' vsebuje največ DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA. Prav tako v primerjavi z ostalimi vzorci OL-385-07 vsebuje največ O-Agl-A, OL-290-07 pa največ L-Agl-A. Vzorca olja OL-385-07 in OL-386-07 sorte 'Oblica' sta pokazala podobna razmerja med FS.

Zanimiv je vzorec OL-298-07, ki ima visoko vsebnost TyrOH in ima v primerjavi z vsemi preiskovanimi vzorci OO največjo vsebnost Tyr. Pri tem vzorcu so se FS razgradile do končnih produktov, kar se kaže v večji vsebnosti TyrOH in Tyr.



Slika 16: Vsebnost fenolnih spojin v vzorcih oljčnega olja iz mešanih sort ter vzorcih olja sort 'Oblica' in 'Buga'

V vseh preiskovanih vzorcih oljčnega olja sta od fenolnih spojin, ki smo jih določili s HPLC analizo, v najnižji koncentraciji zastopana luteolin in apigenin.

Na slikah 14, 15, 16 vidimo, da sta v večini preiskovanih OO lipofilni spojini O-Agl-A in L-Agl-A, ki nastaneta pri odcepitvi glukoze od olevropeina in ligstrozida, prisotni v opazno nižji koncentraciji v primerjavi s spojinama DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA, ki nastaneta po dekarboksilaciji iz spojin O-Agl-dA in L-Agl-dA pri poteku mesenja in v samem OO.

Butinar in Bučar - Miklavčič (2000) omenjata, da visoko razmerje med TyrOH, Tyr in ostalimi FS, kaže na začetek reakcij razgradnje kompleksnih FS (predvsem na sekoiridoidnih glikozidov). Pri teh reakcijah nastajata predvsem TyrOH in Tyr, in če so bili pogoji skladiščenja primerni, se antioksidanti niso porabljali. Velika vsebnost TyrOH ob hkratni veliki vsebnosti FS kaže na olja z dobrimi antioksidativnimi lastnostmi. Vendar je znano, da je koncentracija enostavnih fenolov večja v starejših ali oksidiranih OO (Pirisi in sod., 2000).

Glede na rezultate bi lahko rekli, da se je v preiskovanih vzorcih OO začela razgradnja FS. Zaradi majhne vsebnosti Tyr in TyrOH v primerjavi z ostalimi spojinami lahko sklepamo, da so reakcije razgradnje na začetku poti.

Sveža DOO imajo malo razgradnih produktov, zato vsebujejo veliko O-Agl-dA, L-Agl-dA in sFS ter malo enostavnih FS, kot sta Tyr in TyrOH, starejša olja pa obratno. Vendar povečanje TyrOH ne vpliva na zmanjšanje O-Agl-dA. Oleuropein in ligstrozid sta dve poglaviti fenolni spojini, ki ju najdemo le v oljčnem plodu. Količinsko je največ oleuropeina, ki zaradi dobre topnosti v vodi med tehnološko predelavo oljk ostane v vodni fazi. Lipofilni derivati oleuropeina in ligstrozida, ki nastanejo med endogeno glikozidacijo med mesenjem, se zaradi lipofilnih lastnosti ekstrahirajo v OO. O-Agl-dA in L-Agl-dA sta izomeri oleuropeina in ligstrozida aglikona, ki sta prisotni le v olju. Koncentracija teh spojin je odvisna od sorte, agronomskih in okoljskih dejavnikov ter od shranjevanja olja in načina ekstrakcije (Rovellini in Cortesi, 2002; Lavelli, 2002).

4.1.2 Vsebnost sFS (metoda s Folin-Ciocalteu reagentom)

Z dodatkom reagenta F-C smo spektrofotometrično določili vsebnost sFS v ekstraktu. Ekstrakcijo smo izvedli z 80 % metanolom (m/m). Na vsebnost sFS in posledično na njihovo AU poleg števila ponovitev pri ekstrakciji vplivata tudi izbira topila (heksan, kloroform, petroleter ...) ter volumsko razmerje med metanolom in vodo (60 : 40, 80 : 20, 100 : 0). Prior in sod. (2005) navajajo, da je ekstrakcija kritičen postopek, saj zaradi raznolikosti antioksidantov ni nobenega topila, ki bi bilo optimalno za vse, kar lahko vpliva na dobljene rezultate. Montedoro in sod. (1992) so dobili najboljše rezultate, če so kot ekstracijsko topilo uporabili 80 % metanol (V/V).

V preglednici 6 so prikazane vsebnosti sFS v ekstraktih in v vzorcih OO kot masa galne kisline na mL raztopine ekstrakta oz. na kg oljčnega olja, ker smo za pripravo umeritvene krivulje uporabili galno kislino.

Preglednica 6: Vrednosti za absorbanco A_{786} ter vsebnost sFS v ekstraktih (μg galne kisline/mL raztopine ekstrakta) in v vzorcih OO (mg galne kisline/kg OO)

Vzorec OO	Odtehta OO (g)	A_{786}				Ekstrakt ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	sFS v OO (mg/kg)
		$A_{1(786)}$	$A_{2(786)}$	$\bar{A}_{1(786)}$	$\bar{A}_{2(786)}$		
OL-289-07	40,03	0,9132 0,9135 0,9142	0,7706 0,7693 0,7697	0,9136 ± 0,0005	0,7699 ± 0,0006	6008	375
OL-290-07	40,02	0,3954 0,3957 0,3959	0,4231 0,4243 0,4253	0,3957 ± 0,0003	0,4242 ± 0,0011	1463	91
OL-291-07	40,02	0,6258 0,6261 0,6264	0,8389 0,8393 0,8407	0,6261 ± 0,0003	0,8396 ± 0,0010	7848	490

“se nadaljuje“

Nadaljevanje preglednice 6: Vrednosti za absorbanco A_{786} ter vsebnost sFS v ekstraktih (μg galne kisline/mL raztopine ekstrakta) in v vzorcih OO (mg galne kisline/kg OO)

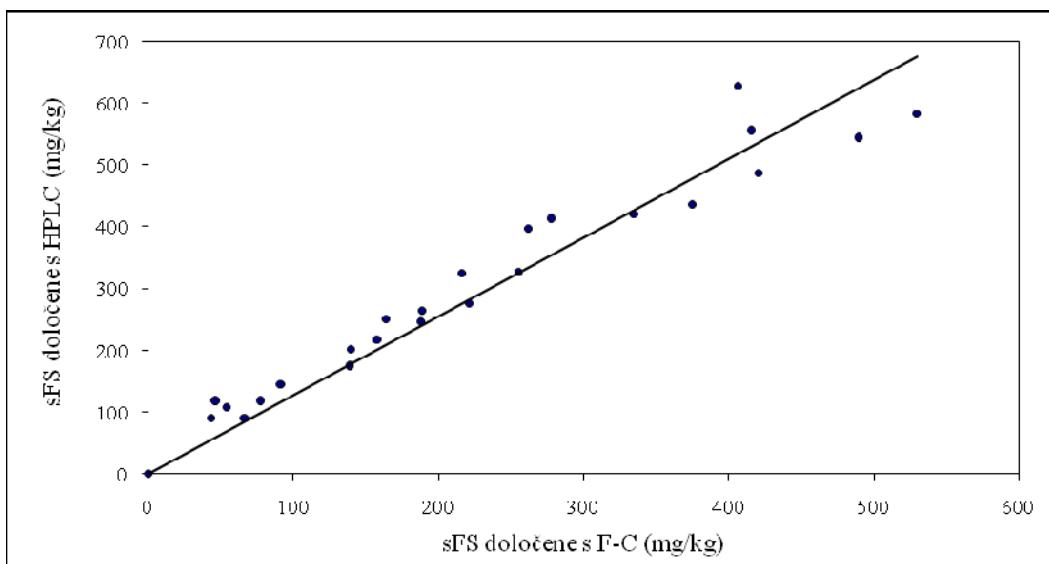
Vzorec OO	Odtehta OO (g)	A_{765}				Ekstrakt ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	sFS v OO (mg/kg)
		$A_{1(765)}$	$A_{2(765)}$	$\bar{A}_{1(765)}$	$\bar{A}_{2(765)}$		
OL-292-07	40,00	0,5873 0,5872 0,5874	0,5567 0,5575 0,5575	0,5873 ± 0,0001	0,5572 ± 0,0004	4084	255
OL-293-07	40,01	0,5471 0,5460 0,5465	0,4966 0,4970 0,4966	0,5465 ± 0,0005	0,4967 ± 0,0002	6517	407
OL-294-07	30,08	0,1430 0,1424 0,1438	0,1575 0,1600 0,1578	0,1431 ± 0,0007	0,1584 ± 0,0013	537	54
OL-295-07	20,06	0,1850 0,1859 0,1849	0,1825 0,1831 0,1834	0,1853 ± 0,0006	0,1830 ± 0,0005	657	66
OL-296-07	40,00	0,3211 0,3223 0,3221	0,3696 0,3697 0,3701	0,3219 ± 0,0007	0,3698 ± 0,0003	1234	77
OL-297-07	40,02	0,7503 0,7506 0,7511	0,7542 0,7539 0,7544	0,7506 ± 0,0004	0,7542 ± 0,0003	5359	335
OL-298-07	40,00	1,0009 1,0009 1,0018	0,8896 0,8901 0,8905	1,0012 ± 0,0005	0,8900 ± 0,0005	6748	421
OL-382-07	40,04	0,5566 0,5547 0,5551	0,4180 0,4161 0,4109	0,5555 ± 0,0010	0,4150 ± 0,0037	3465	216
OL-383-07	30,07	0,4789 0,4788 0,4795	0,4623 0,4625 0,4630	0,4790 ± 0,0004	0,4626 ± 0,0003	1680	140
OL-384-07	30,04	0,5586 0,5591 0,5592	0,5026 0,5023 0,5023	0,5590 ± 0,0003	0,5024 ± 0,0002	1894	158
OL-385-07	40,04	0,5534 0,5538 0,5530	0,6937 0,6942 0,6934	0,5534 ± 0,0004	0,6937 ± 0,0004	4452	278
OL-386-07	40,01	0,5900 0,5898 0,5903	0,6608 0,6607 0,6603	0,5900 ± 0,0003	0,6606 ± 0,0003	2231	139
OL-387-07	30,09	0,1239 0,1205 0,1203	0,1207 0,1210 0,1223	0,1216 ± 0,0020	0,1213 ± 0,0008	433	43
OL-388-07	40,03	0,1949 0,1953 0,1944	0,2148 0,2142 0,2149	0,1949 ± 0,0005	0,2146 ± 0,0004	732	46

“se nadaljuje“

Nadaljevanje preglednice 6: Vrednosti za absorbanco A_{786} ter vsebnost sFS v ekstraktih ($\mu\text{g galne kisline/mL raztopine ekstrakta}$) in v vzorcih OO (mg galne kisline/kg OO)

Vzorec OO	Odtehta OO (g)	A_{765}				Ekstrakt ($\mu\text{g/mL}$)	sFS v OO (mg/kg)
		$A_{1(765)}$	$A_{2(765)}$	$\bar{A}_{1(765)}$	$\bar{A}_{2(765)}$		
OL-389-07	30,07	0,5824 0,5837 0,5867	0,5217 0,5224 0,5213	0,5843 ± 0,0022	0,5218 ± 0,0005	1974	164
OL-390-07	40,01	0,6023 0,6013 0,5994	0,7566 0,7574 0,7575	0,6010 ± 0,0015	0,7572 ± 0,0005	8477	530
OL-391-07	40,05	0,8218 0,8216 0,8215	0,8766 0,8776 0,8771	0,8216 ± 0,0001	0,8771 ± 0,0005	3030	189
OL-392-07	40,03	0,5541 0,5545 0,5527	0,6228 0,6227 0,6233	0,5538 ± 0,0010	0,6229 ± 0,0003	4200	262
OL-393-07	40,02	1,0034 1,0034 1,0050	0,9850 0,9824 0,9824	1,0039 ± 0,0009	0,9833 ± 0,0015	3546	222
OL-394-07	40,00	0,5550 0,5552 0,5555	0,6895 0,6902 0,6901	0,5552 ± 0,0002	0,6899 ± 0,0004	6663	416
OL-395-07	30,07	0,6187 0,6200 0,6205	0,6442 0,6453 0,6473	0,6197 ± 0,0009	0,6456 ± 0,0016	2258	188

Ob primerjavi vsebnosti sFS v preglednici 5, ki smo jih določili s pomočjo HPLC, z vsebnostmi sFS v preglednici 6, ki smo jih določili s F-C metodo, opazimo, da smo s F-C metodo dobili manjše vrednosti kot s HPLC. Na sliki 17 je prikazana linearna odvisnost med omenjenima vsebnostma. Z metodo linearne regresije smo določili smerni koeficient premice, ki znaša: $k = (1,275 \pm 0,035)$, $(r = 0,965)$.



Slika 17: Primerjava vsebnosti skupnih fenolnih spojin, preračunanih na kg oljčnega olja, določenih s HPLC in F-C metodo

Do manjšega odstopanja je lahko prišlo, ker smo pri pripravi ekstraktov za HPLC analizo uporabili interni standard, s katerim smo upoštevali izgube, do katerih lahko pride pri ekstrakciji. Nekateri avtorji omenjajo, da se rezultati določanja sFS s HPLC ne ujemajo z rezultati F-C metode (Montedoro in sod., 1992).

Potrebno je upoštevati, da smo pri ekstarkciji FS za HPLC uporabili 60 % metanol, medtem ko smo pri ekstrakciji za F-C metodo uporabili 80 % metanol. Montedoro in sod. (1992) v članku omenjajo, da različne koncentracije metanola vplivajo na koncentracijo ekstrahiranih fenolnih spojin. Metodi za določanje sFS nista potekali istočasno. Med eno in drugo metodo so minili 3 meseci. V tem času je lahko prišlo do določenih sprememb v olju in na FS, kar je najverjetneje vzrok za odstopanje rezultatov.

4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI FENOLNIH SPOJIN

4.2.1 Sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH•

Metoda temelji na zmanjšanju vsebnosti reaktivne oblike radikala DPPH• v raztopini vsled prisotnosti antioksidanta, ki odda vodikov atom radikalu. Količina DPPH•, ki ostane po določenem času v raztopini, je obratnosorazmerna AU fenolnih spojin (Kulišič in sod., 2004). Delež radikala, ki po 30 min ostane v reakcijski mešanici, smo izračunali po naslednji zvezzi:

$$\% \text{ DPPH}• = \frac{A_{vz\ 517}}{A_{k\ 517}} \times 100\% \quad \dots (18)$$

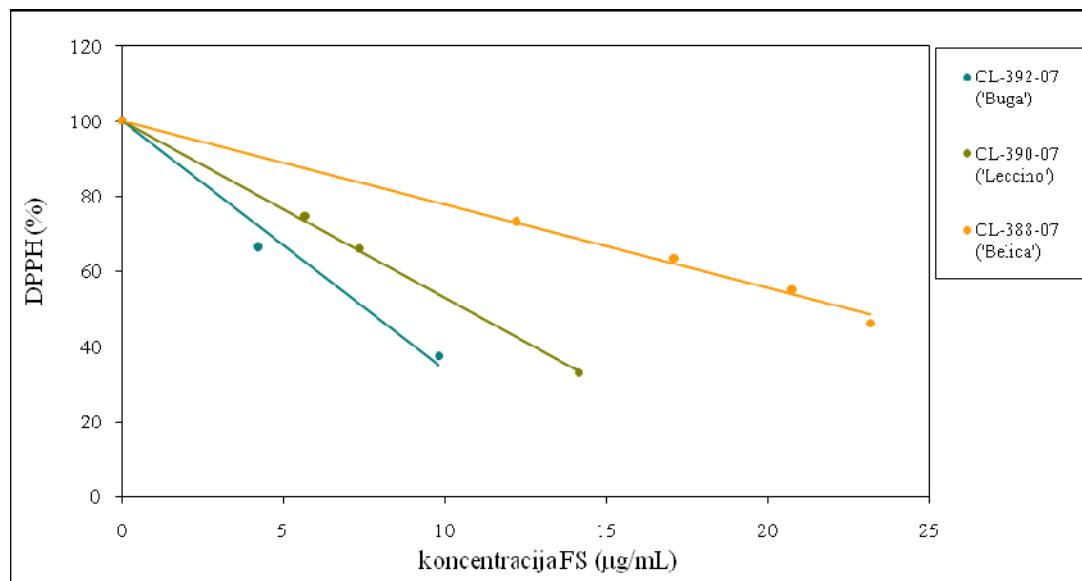
$A_{vz\ 517}$ – absorbanca vzorca po 30 min inkubacije

$A_{k\ 517}$ – absorbanca kontrole

Na sliki 18 je kot primer za tri preiskovane vzorce (OL-392-07, OL-390-07, OL-388-07) prikazana odvisnost % DPPH (ki je ostal v reakcijski mešanici po 30 min inkubacije) od

konzentracije FS v reakcijski mešanici, v območju koncentracij, ko je omenjena odvisnost linearna. Pri višjih vrednostih za koncentracijo namreč omenjena odvisnost ni linearna. Za vsak vzorec smo s pomočjo linearne regresijske analize določili tudi naklon premic, k .

Na sliki 18 lahko glede na naklon sklepamo o učinkovitosti lovljenja radikala. Nižja kot je vrednost naklona, boljša in hitrejša je sposobnost lovljenja radikala. Ekstrakt, ki je bil pripravljen iz vzorca olja OL-392-07 sorte BU, ima najnižji k (-6,6270), saj je imel najučinkovitejši antioksidacijski potencial od vseh štiriindvajsetih vzorcev. Ekstrakt, za katerega smo določili vrednost k -4,7023, je bil pripravljen iz vzorca OL-390-07 sorte L. Med najslabšimi je bil ekstrakt, ki smo ga pridobili iz vzorca olja OL-388-07 sorte BE s k -2,2241.



Slika 18: Delež DPPH•, ki je ostal v reakcijski mešanici po 30 min inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski mešanici

Masno koncentracijo FS v reakcijski mešanici, ki je potrebna za znižanje deleža DPPH• za 50 % (ED_{50}), smo izračunali v skladu z enačbo:

$$ED_{50} = (50\% - 100\%) / k \quad \dots (19)$$

Zaradi majhne vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktu, ki smo ga pridobili iz vzorcev olja OL-294-07, OL-295-07 in OL-387-07, smo lahko sposobnost lovljenja DPPH• radikala preverili v omejenem koncentracijskem območju. Koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih omenjenih vzorcev je bila premajhna, da bi v 30 min uspeli doseči znižanje DPPH• radikala za 50 % začetne vrednosti. Zato smo ob predpostavki, da velja linearna zveza med koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici in % DPPH, izračunali ED_{50} s pomočjo ekstrapolacije in ustrezne enačbe:

$$x(y^*) = x_{k-1} + \frac{y^* - y_{k-1}}{y_k - y_{k-1}} (y_k - y_{k-1}) \quad \dots (20)$$

kjer je $x(y^*)$ vrednost za ED_{50} , y^* ustreza vrednosti % DPPH = 50 %. y_k in y_{k-1} sta dve eksperimentalno določeni vrednosti za % DPPH pri ustreznih vrednostih za koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici x_k in x_{k-1} . Pri tem smo za y_k upoštevali vrednost 100 % in za x_k vrednost 0 µg/mL.

V preglednici 7 so podane absorbance, pomerjene pri $t = 15$ min in $t = 30$ min pri različnih masnih koncentracijah FS v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$), delež preostalega radikala DPPH \cdot po 30 min inkubacije, naklon linearne dela krivulj (k) ter masna koncentracija FS, ki je potrebna za znižanje DPPH \cdot za 50 % (ED_{50}).

Preglednica 7: Vrednosti za absorbanco $A_{\text{vz 517}}$, pomerjene pri $t = 15$ min in $t = 30$ min, masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$), delež preostalega DPPH \cdot po 30 min inkubacije, naklon linearne dela premice (k) ter masna koncentracija FS, potrebna za znižanje DPPH \cdot za 50 % (ED_{50})

Vzorec OO	$A_{\text{vz 517}}$		$\gamma_{r.m.}$	% DPPH	k	ED_{50}
	t (min)					(µg/mL)
	15	30				
OL-289-07	0,9927	0,9708	6,01	77	-3,4286	14,6 ± 0,8
	0,7286	0,7000	14,02	55		
	0,4056	0,3749	20,03	30		
	0,3098	0,2858	26,03	23		
OL-290-07	0,9711	0,9540	4,88	75	-3,7540	13,3 ± 0,5
	0,7495	0,7308	9,75	62		
	0,4529	0,4290	17,07	37		
	0,1366	0,0995	24,38	8		
OL-291-07	0,9247	0,9161	2,62	82	-3,8715	12,9 ± 1,4
	0,6223	0,6065	5,23	54		
	0,3598	0,3382	18,31	30		
	0,1003	0,0990	26,16	9		
OL-292-07	0,8079	0,7910	6,81	71	-4,3939	11,4 ± 0,3
	0,5975	0,5780	10,89	52		
	0,4319	0,4100	17,70	37		
	0,3789	0,3416	21,78	29		
OL-293-07	1,0823	1,0754	4,34	93	-3,9493	12,7 ± 0,2
	0,7820	0,7599	8,69	65		
	0,4948	0,4648	15,21	40		
	0,1050	0,1038	21,72	9		
OL-294-07	0,7477	0,7091	17,9	64	-2,0220	24,7 ± 2,0
OL-295-07	0,8765	0,8416	8,76	80	-2,0800	24,0 ± 2,0
	0,8096	0,7577	13,14	72		
	0,7657	0,6954	17,52	64		
	0,7164	0,6394	21,90	59		
OL-296-07	0,9850	0,9619	4,11	79	-4,9049	10,2 ± 0,1
	0,7495	0,7292	8,23	60		
	0,5152	0,4892	12,34	40		
	0,2786	0,2470	16,45	20		

“se nadaljuje”

Nadaljevanje preglednice 7: Vrednosti za absorbanco $A_{VZ\ 517}$, pomerjene pri $t = 15$ min in $t = 30$ min, masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$), delež preostalega DPPH \cdot po 30 min inkubacije, naklon linearne dela premice (k) ter masna koncentracija FS, potrebna za znižanje DPPH \cdot za 50 % (ED_{50})

Vzorec OO	$A_{VZ\ 517}$		$\gamma_{r.m.}$	% DPPH	k	ED_{50}
	t (min)					
	15	30				
OL-297-07	0,9663	0,9499	5,36	80	-4,0715	12,3 ± 0,3
	0,6233	0,5985	12,50	50		
	0,3399	0,3106	17,86	26		
	0,1780	0,1530	23,22	13		
OL-298-07	0,9268	0,9139	6,75	72	-3,4204	14,6 ± 1,3
	0,7877	0,7629	11,25	60		
	0,6438	0,6181	15,75	49		
	0,3905	0,3655	22,49	29		
OL-382-07	0,8523	0,8324	5,78	72	-4,5638	11,0 ± 0,3
	0,6268	0,6056	9,24	52		
	0,5996	0,5708	11,55	49		
	0,2577	0,2309	17,33	20		
OL-383-07	0,8597	0,8329	5,60	72	-4,8880	10,2 ± 0,2
	1,5710	0,5292	11,20	46		
	0,3743	0,3293	16,80	30		
	0,0834	0,0827	22,40	7		
	0,0820	0,0820	28,00	7		
OL-384-07	0,5674	0,5466	6,31	58	-4,6147	10,8 ± 0,5
	0,4880	0,4546	12,63	39		
	0,2059	0,1655	18,94	14		
	0,0894	0,0813	25,25	7		
	0,0481	0,0470	31,57	5		
OL-385-07	0,9664	0,9469	4,45	80	-5,4570	9,2 ± 0,9
	0,6340	0,6114	7,42	52		
	0,5124	0,4933	10,39	42		
	0,0472	0,0372	14,84	3		
OL-386-07	0,9192	0,9071	3,72	77	-5,2821	9,5 ± 0,7
	0,7041	0,6857	7,44	58		
	0,5552	0,5340	11,16	44		
	0,3322	0,3013	14,87	25		
OL-387-07	0,8949	0,8397	14,43	73	-1,8950	26,4 ± 2,0
OL-388-07	0,9822	0,9358	12,20	73	-2,2241	22,5 ± 0,9
	0,8651	0,8103	17,08	63		
	0,7625	0,7038	20,74	55		
	0,5027	0,4553	23,18	46		
	0,4566	0,4038	24,40	41		

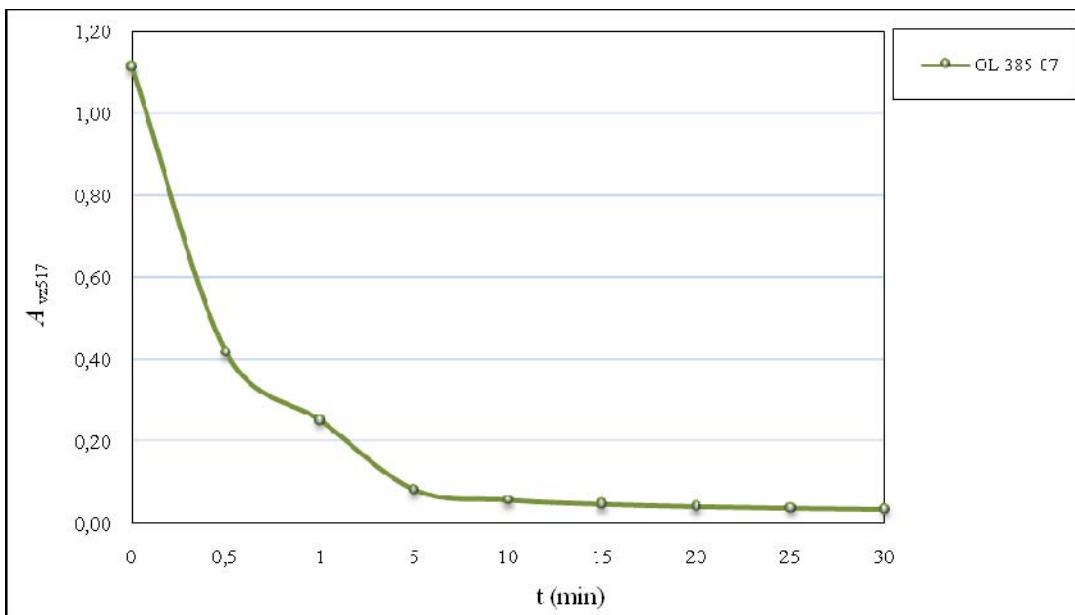
“se nadaljuje”

Nadaljevanje preglednice 7: Vrednosti za absorbanco $A_{vz\ 517}$, pomerjene pri $t = 15$ min in $t = 30$ min, masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$), delež preostalega DPPH \bullet po 30 min inkubacije, naklon linearne dela premice (k) ter masna koncentracija FS, potrebna za znižanje DPPH \bullet za 50 % (ED_{50})

Vzorec OO	$A_{vz\ 517}$		$\gamma_{r.m.}$	% DPPH	k	ED_{50}
	t (min)		($\mu\text{g} / \text{mL}$)	t = 30 min		($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	15	30				
OL-389-07	0,8154	0,7990	6,58	63	-5,2100	9,6 ± 0,6
	0,7421	0,7215	7,90	63		
	0,5082	0,4970	9,87	39		
	0,4383	0,4149	13,16	33		
	0,1263	0,0758	23,03	6		
OL-390-07	0,9003	0,8855	5,65	75	-4,7023	10,6 ± 0,2
	0,7959	0,7811	7,35	66		
	0,4249	0,3900	14,13	33		
	0,2110	0,1790	19,78	15		
OL-391-07	0,9364	0,9231	3,03	80	-6,1943	8,1 ± 0,5
	0,6867	0,6663	6,46	57		
	0,4886	0,4590	10,10	40		
	0,0943	0,0929	18,18	8		
OL-392-07	0,7680	0,7421	4,20	67	-6,6270	7,5 ± 0,8
	0,7418	0,7187	7,00	64		
	0,4426	0,4182	9,80	37		
	0,2030	0,1764	14,00	16		
OL-393-07	0,8626	0,8495	5,91	75	-4,8779	10,3 ± 1,4
	0,6074	0,5801	9,46	51		
	0,3596	0,3204	11,82	28		
	0,2223	0,1826	17,73	16		
OL-394-07	0,8997	0,8833	6,66	75	-3,3363	15,0 ± 0,9
	0,7753	0,7439	11,11	61		
	0,6151	0,5907	15,55	50		
	0,1754	0,1432	22,21	12		
OL-395-07	0,7874	0,7706	7,53	68	-4,1166	12,1 ± 0,6
	0,6446	0,6223	11,29	55		
	0,1556	0,1280	18,82	11		
	0,0799	0,0789	26,34	7		

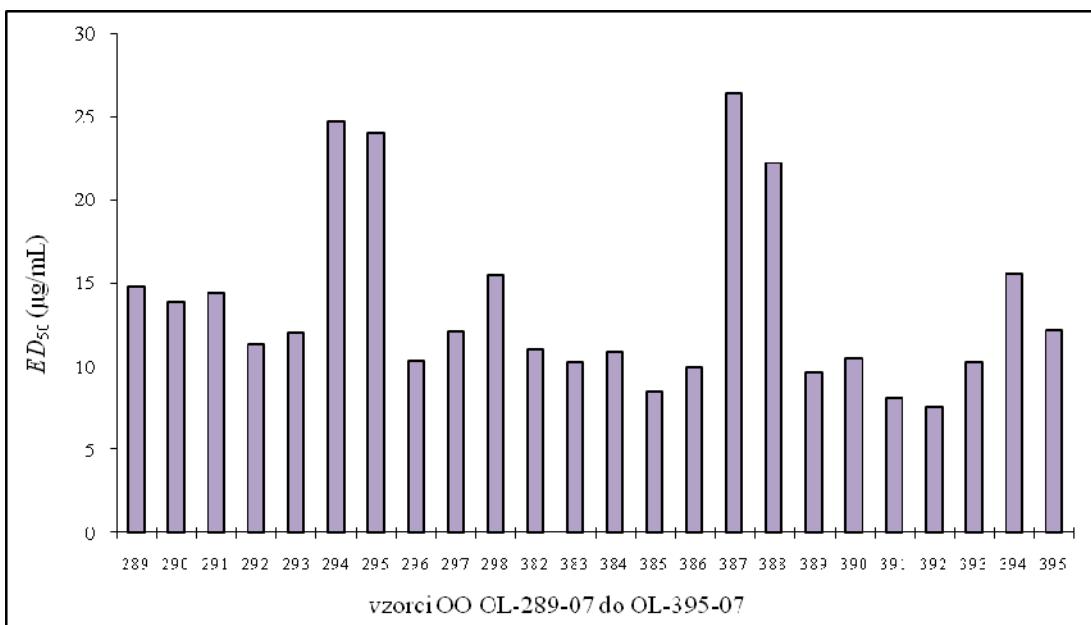
Iz preglednice 7 je razvidno, da je imel vzorec OL-392-07 najnižjo ED_{50} vrednost (7,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kar pomeni, da je med vsemi ekstrakti pokazal najboljšo sposobnost za lovljenje prostega DPPH \bullet radikala. Druga dva najučinkovitejša vzorca sta bila OL-391-07 z $ED_{50} = 8,07 \mu\text{g}/\text{mL}$ in OL-385-07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ z $ED_{50} = 9,16 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Na sliki 19 je kot primer za vzorec OL-385-07 prikazana kinetična krivulja, to je odvisnost $A_{vz\ 517}$ od časa inkubacije FS v reakcijski mešanici pri koncentraciji 4,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Absorbanca s časom upada.



Slika 19: Odvisnost absorbance (A_{517}) od časa inkubacije (t) pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski mešanici

Na sliki 20 so prikazane vrednosti ED_{50} vseh štiriindvajsetih ekstraktov. Med najslabšimi vzorci glede na vrednost ED_{50} so ekstrakti, ki smo jih pridobili iz vzorcev olja OL-294-07, OL-295-07, OL-387-07 in OL-388-07. Vsi širje omenjeni vzorci ne vsebujejo TyrOH in vsebujejo najmanj sFS, določenih s HPLC.



Slika 20: Vrednosti za masno koncentracijo fenolnih spojin, ki je potrebna za znižanje DPPH[•] za 50 % (ED_{50})

Mogoče je, da na sposobnost lovljenja DPPH[•] vpliva koncentracija oziroma prisotnost TyrOH.

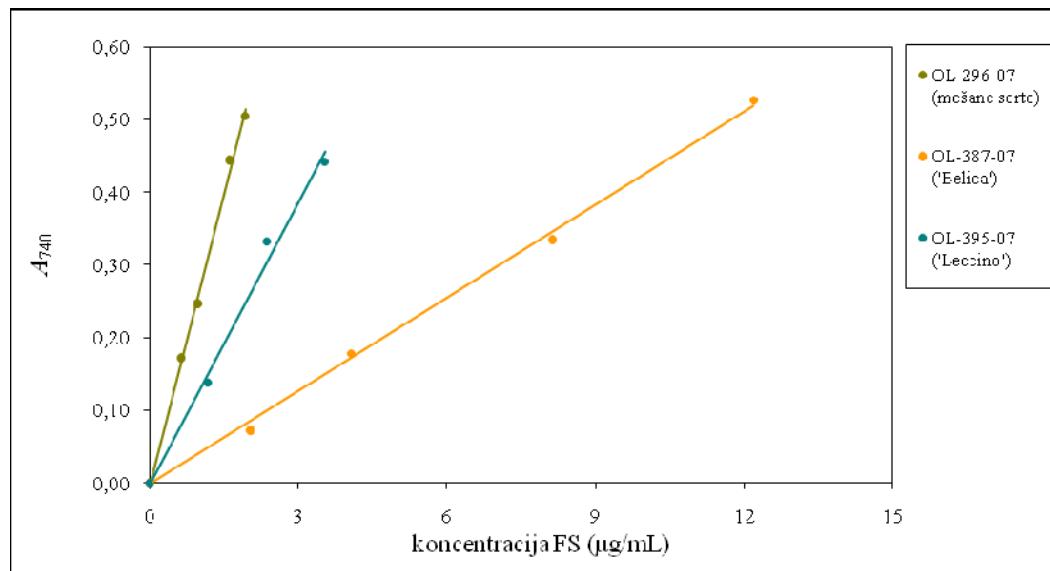
Nekateri avtorji so opazili, da imata olevropein in njegov derivat TyrOH močno sposobnost lovljenja DPPH[•] radikala. TyrOH naj bi bil boljši antioksidant in lovilec prostih radikalov od olevropeina in Tyr (Murkovic in sod., 2005). Lavelli (2002) navaja, da so olja, ki so vsebovala lipofilne izvorne spojine TyrOH, pokazala sposobnost znižati koncentracijo DPPH[•] radikala. AU pa je povezana tudi z degredacijsko stopnjo olja. Dokazali so, da so bila sveža EDOO 3–5 krat učinkovitejša od starejših olj, in testi, ki so bili narejeni na čistih FS, so pokazali, da na AU olja najbolj vplivajo TyrOH in njegove izvorne spojine (DMO-Agl-dA, O-Agl-A), manj pa Tyr in njegove izvorne spojine (DML-Agl-dA, L-Agl-A). Lavelli (2002) je ugotovil, da je vsota vsebnosti izvornih spojin TyrOH v korelaciji z AU, ki so jo določili z DPPH[•] radikalom. S teorijo, ki jo izpostavlja Lavelli, bi lahko povezali vzorec OL-385-07, ki vsebuje največ O-Agl-A in je med učinkovitejšimi pri lovljenju DPPH[•], ter vzorec OL-389-07, ki vsebuje največ TyrOH in je ravno tako med učinkovitejšimi. Oba vsebujeta največ spojine, ki je derivat *o*-difenolov. Izstopa le vzorec OL-390-07, ki vsebuje največ DMO-Agl-dA, vendar ni med najučinkovitejšimi na DPPH[•].

4.2.2 Sposobnost redukcije železovega iona

Pri analizi reduksijske sposobnosti smo z merjenjem absorbance A_{740} določili, v kolikšni meri je dani ekstrakt OO sposoben reducirati ion Fe^{3+} v ion Fe^{2+} . A_{740} je merilo za vsebnost iona Fe^{2+} .

Na sliki 21 je kot primer za tri vzorce (OL-296-07, OL-387-07, OL-395-07) prikazana odvisnost A_{740} od koncentracije FS v reakcijski mešanici. Vidimo, da A_{740} linearno narašča s koncentracijo FS v reakcijski mešanici.

Sposobnost redukcije smo kvantitativno ovrednotili tako, da smo s pomočjo linearne regresijske analize izračunali naklon premic in le-tega podali kot reduksijsko moč (C_R). Večji naklon pomeni večjo C_R vzorca.



Slika 21: Odvisnost absorbance (A_{740}) od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski mešanici

Vrednosti za A_{740} v odvisnosti od koncentracije FS v reakcijski mešanici in vrednosti C_R so prikazane v preglednici 8. Iz preglednice je razvidno, da je najboljša reduksijska moč pokazal vzorec OL-296-07 s C_R $0,267 \text{ } (\mu\text{g/mL})^{-1}$. Sledita mu vzorca OL-290-07 in OL-392-07 s C_R $0,256 \text{ } (\mu\text{g/mL})^{-1}$ in $0,245 \text{ } (\mu\text{g/mL})^{-1}$.

Preglednica 8: Vrednosti za absorbanco (A_{740}) v odvisnosti od koncentracije FS v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$) in reduksijska moč (C_R) ekstraktov oljčnega olja

Vzorec OO	$\gamma_{r.m.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{740}			\bar{A}_{740}		C_R ($\mu\text{g/mL}$) $^{-1}$
		$A_{1(740)}$	$A_{2(740)}$	$A_{3(740)}$			
OL-289-07	0,94	0,0690	0,0700	0,0709	0,06996 ± 0,0010		0,167 ± 0,006
	1,56	0,2584	0,2598	0,2609	0,25968 ± 0,0013		
	2,50	0,4652	0,4668	0,4684	0,46678 ± 0,0016		
	3,13	0,4055	0,4069	0,4093	0,40722 ± 0,0019		
	4,69	0,7541	0,7555	0,7564	0,75533 ± 0,0011		
OL-290-07	0,76	0,1992	0,1999	0,2010	0,20001 ± 0,0009		0,256 ± 0,005
	1,52	0,3983	0,4009	0,4026	0,40062 ± 0,0022		
	1,90	0,4453	0,4449	0,4462	0,44545 ± 0,0007		
	2,29	0,5780	0,5771	0,5778	0,57761 ± 0,0005		
	2,67	0,6342	0,6359	0,6375	0,63588 ± 0,0016		
OL-291-07	0,82	0,0841	0,0846	0,0852	0,08466 ± 0,0006		0,145 ± 0,003
	1,64	0,2121	0,2131	0,2141	0,21311 ± 0,0010		
	2,45	0,2913	0,2922	0,2931	0,29221 ± 0,0009		
	3,27	0,4855	0,4873	0,4890	0,48727 ± 0,0018		
	4,09	0,5926	0,5932	0,5946	0,59346 ± 0,0010		
OL-292-07	0,64	0,0721	0,0731	0,0734	0,07286 ± 0,0006		0,206 ± 0,006
	1,06	0,1845	0,1857	0,1864	0,18553 ± 0,0010		
	1,70	0,3631	0,3635	0,3646	0,36374 ± 0,0008		
	2,13	0,4660	0,4672	0,4684	0,46719 ± 0,0012		
	2,55	0,5074	0,5082	0,5098	0,50846 ± 0,0012		
OL-293-07	0,68	0,1191	0,1199	0,1201	0,11973 ± 0,0005		0,154 ± 0,003
	1,36	0,1915	0,1929	0,1942	0,19287 ± 0,0013		
	2,04	0,3086	0,3072	0,3099	0,30859 ± 0,0013		
	2,72	0,4594	0,4612	0,4628	0,46114 ± 0,0017		
	3,39	0,5273	0,5288	0,5303	0,52878 ± 0,0015		
OL-294-07	2,52	0,0707	0,0706	0,0706	0,07062 ± 0,0000		0,050 ± 0,001
	5,03	0,2327	0,2331	0,2331	0,23293 ± 0,0002		
	10,06	0,4762	0,4778	0,4795	0,47781 ± 0,0016		
	15,09	0,7638	0,7653	0,7679	0,76566 ± 0,0021		
	20,13	1,0998	1,1034	1,1075	1,10356 ± 0,0039		
OL-295-07	1,37	0,2797	0,2806	0,2809	0,28040 ± 0,0006		0,200 ± 0,001
	2,74	0,5522	0,5545	0,5534	0,55335 ± 0,0012		
	5,48	1,0908	1,0905	1,0929	1,09140 ± 0,0013		
OL-296-07	0,64	0,1709	0,1720	0,1729	0,17194 ± 0,0010		0,267 ± 0,004
	0,96	0,2457	0,2468	0,2480	0,24684 ± 0,0011		
	1,29	0,3716	0,3729	0,3735	0,37266 ± 0,0010		
	1,61	0,4434	0,4446	0,4461	0,44469 ± 0,0014		
	1,93	0,5036	0,5053	0,5070	0,50529 ± 0,0017		

“se nadaljuje”

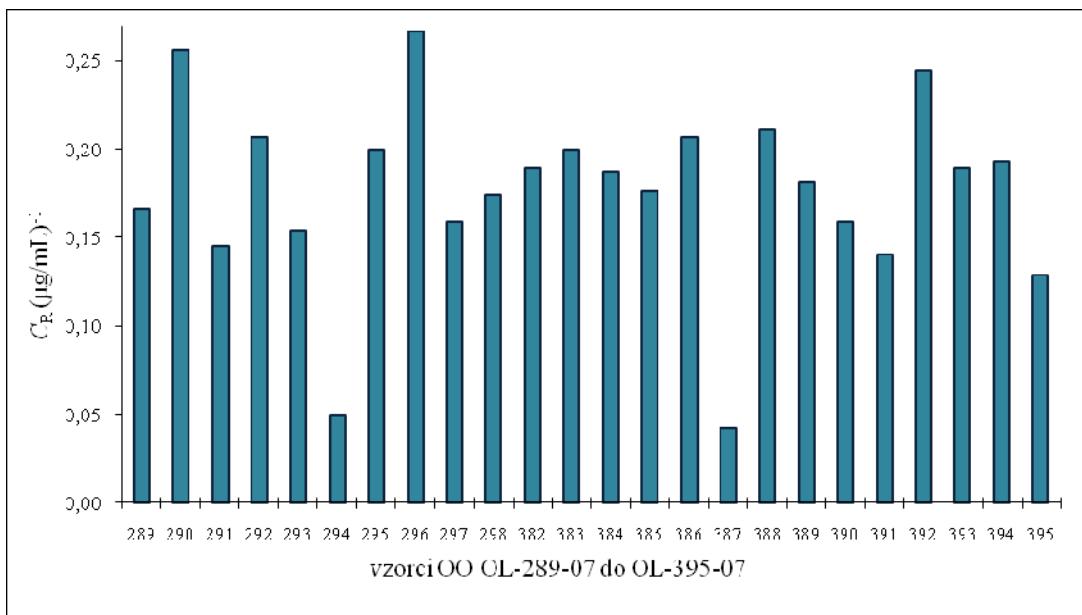
Nadaljevanje preglednice 8: Vrednosti za absorbanco (A_{740}) v odvisnosti od koncentracije FS v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$) in reduksijska moč (C_R) ekstraktov oljčnega olja

Vzorec OO	$\gamma_{r.m.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{740}			\bar{A}_{740}	C_R ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
		$A_{1(740)}$	$A_{2(740)}$	$A_{3(740)}$		
OL-297-07	0,84	0,0117	0,0128	0,0370	0,02051 ± 0,0143	0,159 ± 0,003
	1,40	0,1697	0,1711	0,0172	0,11932 ± 0,0884	
	2,23	0,3333	0,3343	0,3356	0,33439 ± 0,0011	
	2,79	0,4330	0,4344	0,4359	0,43443 ± 0,0015	
	4,19	0,6798	0,6811	0,6828	0,68123 ± 0,0015	
OL-298-07	0,70	0,0675	0,0682	0,0693	0,06835 ± 0,0009	0,174 ± 0,001
	1,41	0,2369	0,2364	0,2382	0,23715 ± 0,0009	
	2,11	0,3689	0,3707	0,3719	0,37046 ± 0,0015	
	2,81	0,4904	0,4881	0,4869	0,48843 ± 0,0018	
	3,51	0,6137	0,6119	0,6105	0,61203 ± 0,0016	
OL-382-07	0,90	0,1492	0,1494	0,1498	0,14945 ± 0,0003	0,190 ± 0,007
	1,80	0,3731	0,3735	0,3744	0,37369 ± 0,0007	
	2,71	0,4955	0,4964	0,4976	0,49646 ± 0,0010	
	0,36	0,0787	0,0808	0,0804	0,07995 ± 0,0011	
	0,41	0,0991	0,0969	0,0973	0,09778 ± 0,0012	
OL-383-07	0,88	0,1127	0,1131	0,1138	0,11323 ± 0,0006	0,200 ± 0,009
	2,19	0,5097	0,5089	0,5080	0,50886 ± 0,0009	
	2,63	0,4864	0,4877	0,4888	0,48763 ± 0,0012	
	3,50	0,5753	0,5764	0,5781	0,57663 ± 0,0014	
	4,38	0,9097	0,9082	0,9128	0,91023 ± 0,0023	
OL-384-07	0,99	0,1819	0,1808	0,1793	0,18065 ± 0,0013	0,187 ± 0,001
	2,47	0,4722	0,4736	0,4748	0,47353 ± 0,0013	
	2,96	0,5425	0,5441	0,5462	0,54424 ± 0,0019	
	3,95	0,6167	0,6151	0,6135	0,61510 ± 0,0016	
	4,93	0,9208	0,9243	0,9262	0,92378 ± 0,0027	
OL-385-07	0,70	0,0968	0,0973	0,0981	0,09743 ± 0,0007	0,177 ± 0,004
	1,16	0,1834	0,1838	0,1847	0,18399 ± 0,0007	
	1,86	0,3448	0,3456	0,3454	0,34526 ± 0,0004	
	2,32	0,4198	0,4203	0,4212	0,42041 ± 0,0007	
	2,78	0,4774	0,4784	0,4792	0,47831 ± 0,0009	
OL-386-07	1,16	0,2076	0,2087	0,2096	0,20861 ± 0,0010	0,206 ± 0,004
	2,32	0,4839	0,4848	0,4863	0,48498 ± 0,0012	
	2,90	0,5689	0,5716	0,5720	0,57081 ± 0,0017	
	3,49	0,7237	0,7267	0,7270	0,72579 ± 0,0018	
	4,07	0,9091	0,9111	0,9126	0,91096 ± 0,0018	
OL-387-07	2,03	0,0715	0,0722	0,0727	0,07212 ± 0,0006	0,043 ± 0,001
	4,06	0,1778	0,1780	0,1783	0,17803 ± 0,0002	
	8,13	0,3336	0,3349	0,3357	0,33473 ± 0,0010	
	12,19	0,5241	0,5264	0,5281	0,52621 ± 0,0020	
	16,25	0,7484	0,7505	0,7524	0,75043 ± 0,0020	

“se nadaljuje”

Nadaljevanje preglednice 8: Vrednosti za absorbanco (A_{740}) v odvisnosti od koncentracije FS v reakcijski mešanici ($\gamma_{r.m.}$) in reduksijska moč (C_R) ekstraktov oljčnega olja.

Vzorec OO	$\gamma_{r.m.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{740}			\bar{A}_{740}	C_R ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
		$A_{1(740)}$	$A_{2(740)}$	$A_{3(740)}$		
OL-388-07	0,95	0,1795	0,1806	0,1815	0,18052 ± 0,0010	0,212 ± 0,002
	1,91	0,3849	0,3865	0,3881	0,38650 ± 0,0016	
	2,86	0,5964	0,5985	0,5996	0,59818 ± 0,0016	
	3,81	0,8210	0,8229	0,8245	0,82279 ± 0,0018	
	4,77	1,0098	1,0111	1,0137	1,01153 ± 0,0020	
OL-389-07	1,03	0,1743	0,1758	0,1777	0,17593 ± 0,0017	0,181 ± 0,001
	2,06	0,2974	0,2996	0,3010	0,29932 ± 0,0018	
	3,08	0,4962	0,4976	0,4996	0,49779 ± 0,0017	
	4,11	0,7428	0,7437	0,7455	0,74397 ± 0,0014	
	5,14	0,9332	0,9378	0,9353	0,93543 ± 0,0023	
OL-390-07	0,44	0,0160	0,0155	0,0148	0,01542 ± 0,0006	0,159 ± 0,001
	1,32	0,1504	0,1495	0,1484	0,14943 ± 0,0010	
	2,21	0,2941	0,2957	0,2972	0,29566 ± 0,0015	
	3,09	0,4983	0,4971	0,4957	0,49703 ± 0,0013	
	3,53	0,5598	0,5579	0,5564	0,55803 ± 0,0017	
OL-391-07	1,58	0,2388	0,2395	0,2397	0,23933 ± 0,0005	0,141 ± 0,001
	3,16	0,4338	0,4344	0,4352	0,43447 ± 0,0007	
	4,73	0,6164	0,6174	0,6179	0,61720 ± 0,0007	
	5,52	0,7886	0,7897	0,7900	0,78945 ± 0,0007	
	6,31	0,8757	0,8781	0,8790	0,87758 ± 0,0017	
OL-392-07	0,66	0,0853	0,0858	0,0861	0,08571 ± 0,0004	0,245 ± 0,003
	1,09	0,2456	0,2462	0,2469	0,24621 ± 0,0006	
	1,75	0,4316	0,4304	0,4328	0,43160 ± 0,0012	
	2,19	0,5533	0,5546	0,5563	0,55470 ± 0,0015	
	3,28	0,7944	0,7963	0,7978	0,79617 ± 0,0017	
OL-393-07	0,92	0,1277	0,1261	0,1271	0,12697 ± 0,0008	0,190 ± 0,004
	1,85	0,2907	0,2906	0,2913	0,29087 ± 0,0004	
	2,77	0,4923	0,4924	0,4932	0,49263 ± 0,0005	
	3,69	0,6889	0,6900	0,6905	0,68980 ± 0,0008	
	4,62	0,9029	0,9041	0,9053	0,90409 ± 0,0012	
OL-394-07	0,69	0,0593	0,0602	0,0612	0,06025 ± 0,0009	0,193 ± 0,001
	1,39	0,2036	0,2050	0,2062	0,20495 ± 0,0013	
	2,08	0,4027	0,4043	0,4061	0,40435 ± 0,0017	
	2,78	0,5352	0,5378	0,5389	0,53730 ± 0,0019	
	3,47	0,6652	0,6664	0,6679	0,66651 ± 0,0014	
OL-395-07	1,18	0,1373	0,1378	0,1381	0,13777 ± 0,0004	0,129 ± 0,005
	2,35	0,3311	0,3316	0,3325	0,33171 ± 0,0007	
	3,53	0,4390	0,4411	0,4433	0,44110 ± 0,0022	
	4,70	0,9499	0,9521	0,9536	0,95186 ± 0,0019	
	5,88	0,9668	0,9681	0,9701	0,96833 ± 0,0017	



Slika 22: Prikaz redukcijske moči (C_R) za preiskovane vzorce

Vzorci OL-294-07, OL-295-07, OL-387-07 in OL-388-07, kot je bilo že omenjeno, ne vsebujejo TyrOH. Vzorca OL-387-07 in OL-294-07 sta v primerjavi z ostalimi preiskovanimi vzorci pokazala najslabšo sposobnost redukcije (najnižja vrednost C_R), medtem ko sta vzorca OL-388-07 in OL-295-07 glede na vrednost C_R med vzorci, ki so se pokazali kot učinkoviti v redukciji iona Fe^{3+} , kar je tudi razvidno na sliki 22. Mogoče je, da TyrOH nima takega vpliva na redukcijo kovinskih ionov, kot ga ima na DPPH \cdot .

4.2.3 Preverjanje vpliva sorte na vsebnost fenolnih spojin in AU ter povezave med vsebnostjo FS in AU

Da bi preverili vpliv sorte oljk na vsebnost fenolnih spojin v oljčnem olju oziroma na antioksidativno učinkovitost ekstrakta, smo podatke statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999). V preglednici 9 so za posamezne sorte podane povprečne vrednosti merjenih parametrov (posamezne in skupne fenolne spojine ter ED_{50} in C_R), ki so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in primerjane pri 5 % tveganju. Rezultati statistične analize v preglednici 9 nam povedo, da se olja po vsebnosti TyrOH, Tyr, luteolina, DMO-Agl-dA, asigniranih fenolnih spojin in vsebnosti sFS glede na sorto oljk med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Med sortami pa obstaja statistično značilna razlika v vsebnosti DML-Agl-dA, lignanov, O-Agl-A, L-Agl-A, apigenina in neasigniranih fenolnih spojin. Prav tako sorte oljk statistično značilno ne vpliva na sposobnost ekstraktov za redukcijo kovinskih ionov oz. lovljenje prostih radikalov.

Preglednica 9: Vpliv sorte na vsebnost posameznih in skupnih fenolnih spojin, na sposobnost lovljenja prostih radikalov ter na sposobnost redukcije

Vsebnosti in lastnosti	Sorta					p vrednost
	'Itrska belica'	'Buga'	'Oblica'	'Leccino'	mešano	
TyrOH (mg/kg)	5,4 ± 11 ^a	4,50 ± 0,03 ^a	10 ± 3 ^a	5 ± 10 ^a	6 ± 9 ^a	0,9195
Tyr (mg/kg)	9 ± 12 ^a	6,42 ± 0,01 ^a	8 ± 3 ^a	9 ± 9 ^a	14 ± 14 ^a	0,5345
DMO-Agl-dA (mg/kg)	52 ± 45 ^{a,b}	110,31 ± 0,02 ^a	54 ± 20 ^{a,b}	64 ± 68 ^{a,b}	27 ± 22 ^b	0,0550
DML-AgL-dA (mg/kg)	60 ± 42 ^{a,b}	77 ± 1 ^a	9 ± 10 ^c	54 ± 38 ^{a,b}	34 ± 8 ^{b,c}	0,0078
lignani (mg/kg)	36 ± 21 ^a	17,1 ± 0,2 ^a	13 ± 10 ^a	16 ± 10 ^a	22 ± 23 ^a	0,0232
O-Agl-A (mg/kg)	15 ± 9 ^{b,c}	21 ± 1 ^{a,b}	30 ± 8 ^a	6 ± 4 ^c	9 ± 10 ^c	<0,0001
L-Agl-A (mg/kg)	15 ± 7 ^a	5,7 ± 0,3 ^b	9,1 ± 0,5 ^{a,b}	8 ± 2 ^b	12 ± 4 ^{a,b}	0,0010
luteoli (mg/kg)	3 ± 1 ^a	2,96 ± 0,01 ^a	1,5 ± 1 ^a	3 ± 2 ^a	2 ± 2 ^a	0,2126
apigenin (mg/kg)	2,3 ± 0,7 ^a	1,62 ± 0 ^{a,b}	1,0 ± 0,8 ^b	1,3 ± 0,7 ^b	1 ± 0,9 ^b	<0,0001
asignirane fenolne spojine (mg/kg)	193 ± 97 ^a	242,6 ± 0,6 ^a	132 ± 40 ^a	162 ± 113 ^a	124 ± 75 ^a	0,1288
neasignirane fenolne spojine (mg/kg)	183 ± 96 ^a	154,2 ± 0,9 ^a	161 ± 97 ^a	87 ± 41 ^a	107 ± 79 ^a	0,0084
sFS (mg/kg)	376 ± 188 ^a	396,9 ± 0,2 ^a	294 ± 138 ^a	252 ± 151 ^a	231 ± 152 ^a	0,0617
ED₅₀	15,6 ± 5,5 ^a	7,54 ± 1,1 ^b	9,3 ± 0,9 ^{a,b}	12 ± 5 ^{a,b}	14 ± 5 ^{a,b}	0,0815
C_R	0,162 ± 0,05 ^b	0,245 ± 0,004 ^a	0,19 ± 0,02 ^{a,b}	0,17 ± 0,03 ^b	0,18 ± 0,07 ^{a,b}	0,2794

značilnost: $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ^{abc} sorte z različno nadpisano črko se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

V okviru statistične obdelave podatkov smo izračunali tudi Pearsonov korelacijski koeficient, r, med vsebnostmi posameznih fenolnih spojin (v mg/kg olja). Kot merilo, ali obstaja statistično značilna povezava med danima parametrom, smo vzeli vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta $|r| > 0,75$.

Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna pozitivna korelacija med:

- vsebnostjo TyrOH in vsebnostjo Tyr,
- vsebnostjo DMO-Agl-dA in vsebnostmi DML-AgL-dA, luteolina oz. asigniranih fenolnih spojin,
- vsebnostjo DML-AgL-dA in vsebnostjo asigniranih fenolnih spojin,
- vsebnostjo lignanov in vsebnostmi apigenina oz. neasigniranih fenolnih spojin,
- vsebnostjo O-Agl-A in vsebnostjo neasigniranih fenolnih spojin,
- vsebnostjo luteolina in vsebnostmi apigenina, asigniranih oz. neasigniranih fenolnih spojin,
- vsebnostjo apigenina in vsebnostmi neasigniranih fenolnih spojin.

Z vsebnostjo sFS so v statistično značilni pozitivni povezavi vsebnosti DMO-Agl-dA, DML-Agl-dA, luteolina, apigenina, asigniranih in neasigniranih fenolnih spojin. Glede na vrednost Perasonovega korelacijskega koeficienta bi lahko pripisali statistično značilno pozitivno povezavo med vsebnostjo asigniranih in vsebnostjo neasigniranih fenolnih spojin.

Za preiskovane ekstrakte oljčnega olja smo poskušali tudi ugotoviti, ali obstaja statistično značilna povezava med vsebnostjo posameznih FS (izraženo kot masni delež glede na vsebnost skupnih fenolnih spojin) in sposobnostjo redukcije oz. sposobnostjo lovljenja prostih radikalov. V naši raziskavi rezultati statistične analize niso pokazali statistično značilne povezave med sposobnostjo redukcije oz. sposobnostjo lovljenja prostih radikalov ter vsebnostjo posameznih FS. Izkazalo se je, da med FS, ki smo jih v okviru naše raziskave ovrednotili s HPLC, s sposobnostjo lovljenja prostih radikalov v najvišji meri korelirata DMO-Agl-dA in L-Agl-A. Pri tem gre za negativno povezavo med ED_{50} in masnim deležem DMO-Agl-dA ($r = -0,736$), kar pomeni, da se z večanjem vsebnosti DMO-Agl-dA veča sposobnost ekstraktov za lovljenje prostih radikalov, oz. pozitivno povezavo med ED_{50} in masnim deležem L-Agl-A ($r = 0,700$), kar pomeni, da se omenjena sposobnost zmanjša pri povečani vsebnosti L-Agl-A v ekstraktu.

Na podlagi ugotovitev, da je vsota vsebnosti TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A v povezavi z AU, ki so jo določili z DPPH[•] radikalom, je Lavelli (2002) povezel, da spojine iz družine *o*-difenolov najbolj prispevajo k antioksidativni učinkovitosti EDOO. Z omenjeno ugotovitvijo se skladajo tudi rezultati statistične analize v naši raziskavi, saj smo določili negativno statistično značilno linearno povezavo ($r = -0,881$) med ED_{50} in skupno vsebnostjo TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A. Preverili smo tudi, v kolikšni meri ED_{50} korelira s skupno vsebnostjo Tyr, DML-Agl-dA, L-Agl-A, ter ugotovili, da se sposobnost lovljenja prostih radikalov poveča z večjo vsebnostjo omenjenih spojin v ekstraktu ($r = -0,620$). Medtem ko vrednosti Perasonovih korelacijskih koeficientov kažejo, da sposobnost redukcije ekstraktov ni v statistično značilni povezavi s skupno vsebnostjo TyrOH, DMO-Agl-dA in O-Agl-A ($r = 0,347$) oziroma s skupno vsebnostjo Tyr, DML-Agl-dA in L-Agl-A ($r = -0,066$).

Prav tako v naši raziskavi nismo določili statistično značilne linearne povezave med sFS in ED_{50} ($r = -0,394$) oz. C_R ($r = -0,012$). Nekateri avtorji (Locatelli in sod. 2009; Gorinstein in sod., 2003) navajajo, da ni povezave med sFS in AU. Gorinstein in sod. (2003) so v članku dokazali obratno, saj so dobili linearno povezavo med sFS in sposobnostjo lovljenja DPPH[•] radikala. F-C reagent praktično meri redukcijsko sposobnost vzorca. Nekateri avtorji opisujejo, da so rezultati, dobljeni s F-C metodo in metodo redukcije železovega iona, v linearni povezavi (Huang in sod., 2005). Številne publikacije omenjajo, da pri uporabi metode s F-C reagentom in metode, ki temelji na prenosu elektrona, obstaja linearna korelacija med določenimi sFS in njihovo AU (Huang in sod., 2005).

Vrednost Perasonovega korelacijskega koeficienta za povezavo med ED_{50} in C_R znaša $-0,492$, kar sicer pomeni, da se z višanjem redukcijske sposobnosti veča tudi sposobnost lovljenja prostih radikalov, vendar kaže na slabo povezavo med obema parametromi. V virih pogosto navajajo, da se rezultati redukcije železovega iona, ki temelji na prenosu elektrona, slabo ujemajo z rezultati ostalih antioksidativnih metod (Prior in sod., 2005). Nekatere raziskave (Foti in sod., 2004) kažejo, da reakcija med DPPH[•] in FS temelji na hitrem prenosu elektrona iz fenoksidnega aniona na DPPH[•], saj je prenos H-atoma prepočasen v topilih, kot sta metanol in etanol. V tem primeru bi za preiskovane ekstrakte sicer pričakovali boljšo povezavo med ED_{50} in C_R . Po mnenju nekaterih drugih avtorjev (Roginsky in Lissi, 2005) naj bi bil

prevladajoči mehanizem reakcije prenos H-atoma, pri kateri FS deaktivirajo prosti DPPH[•] radikal, vzrok za slabo povezavo med rezultati obeh metod. Tudi naključno prisotne baze in kisline v topilu lahko vplivajo na ionizacijsko ravnotežje FS in povzročijo odstopanje od dejanskih vrednosti.

Glede na rezultate statistične analize bi lahko sklepali, da na AU ekstrakta, ki je zmes spojin z različnim antioksidativnim učinkom, vpliva več dejavnikov hkrati. Pri tem igra poglavito vlogo medsebojni vpliv teh strukturno raznolikih spojin. Poleg tega pa najverjetneje dane FS učinkovitejše delujejo kot lovilci prostih radikalov, medtem ko so druge spojine v zmesi boljši reducenti.

5 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo v ekstraktih oljčnega olja določili fenolne spojine z dvema različnima metodama ter rezultate med seboj primerjali. Z dvema različnima metodama smo določili njihovo antioksidativno učinkovitost in preverili, ali obstaja statistično pozitivna povezava z vsebnostjo fenolnih spojin. Preverili smo tudi, ali sorta vpliva na vsebnost posameznih in skupnih fenolnih spojin ter na njihovo antioksidativno učinkovitost.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo sklepali naslednje:

- Oljčno olje vsebuje fenolne spojine.
- Metodi, s katerima smo določili skupne fenolne spojine, sta pokazali linearno povezano.
- Vsem ekstraktom smo z dvema metodama dokazali antioksidativno učinkovitost: ekstrakti so pokazali sposobnost lovljenja prostih radikalov ter sposobnost reduciranja kovinskih ionov.
- Vsebnost skupnih fenolnih spojin ne vpliva na sposobnost lovljenja prostih radikalov ter na sposobnost reduciranja kovinskih ionov.
- Sorta statistično značilno ne vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin in ne vpliva na sposobnost ekstraktov za lovljenje prostih radikalov oziroma redukcijo kovinskih ionov.
- Sorta statistično značilno vpliva na vsebnost naslednjih fenolnih spojin: DML-Agl-dA, lignane, O-Agl-A, L-Agl-A, apigenin in neasignirane fenolne spojine.
- Obstaja statistično značilna pozitivna povezava med posameznimi fenolnimi spojinami.
- Statistična obdelava je pokazala slabo povezano med metodama za določanje antioksidativne učinkovitosti.
- Rezultati statistične analize niso pokazali statistično značilne povezave med sposobnostjo redukcije oz. sposobnostjo lovljenja prostih radikalov ter vsebnostjo posameznih FS.
- S sposobnostjo lovljenja prostih radikalov v najvišji meji korelirata DMO-Agl-dA in L-Agl-A.
- Večja kot je skupna vsebnost TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A oziroma Tyr, DML-Agl-dA, L-Agl-A, boljša je sposobnost lovljenja prostih radikalov.
- Sposobnost redukcije ekstraktov ni v statistično značilni povezavi s skupno vsebnostjo TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A oz. s skupno vsebnostjo Tyr, DML-Agl-dA, L-Agl-A.

Rezultati našega raziskovalnega dela so delno potrdili naše delovne hipoteze.

6 POVZETEK

V diplomskem delu smo iz štiriindvajsetih vzorcev oljčnega olja, ki so izhajali iz Slovenske Istre in otoka Krka, ekstrahirali fenolne spojine. Za ekstrakcijo smo uporabili 60 % oz. 80 % metanol (V/V). Z dvema metodama smo ekstraktom določili vsebnost fenolnih spojin in jih podali v mg/kg oljčnega olja. Z metodo HPLC smo določili skupne in posamezne fenolne spojine, z reagentom Folin-Ciocalteu pa smo določili skupne fenolne spojine. Rezultati so pokazali linearno povezanost med obema metodama. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v oljčnih oljih je bila od 90 do 628 mg/kg olja.

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo dokazali z dvema metodama (lovljenje prostih radikalov in sposobnost reduciranja kovinskih ionov). Sposobnost lovljenja prostega radikala smo izrazili kot koncentracijo fenolnih spojin, ki v določenem času zmanjša začetno vsebnost DPPH[•] radikala za 50 % (ED_{50}). Sposobnost redukcije smo izrazili kot naklon premice, ki podaja odvisnost absorbance od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski mešanici (C_R). Vrednosti za ED_{50} preiskovanih olj so od 7,5 do 26,4 µg/mL. Vrednosti za C_R preiskovanih olj so od 0,267 do 0,043 ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹. Izkazalo se je, da skupno število fenolnih spojin ne vpliva na lovljenje prostih radikalov oziroma na redukcijo kovinskih ionov. Prav tako metodi, ki smo ju uporabili za določitev antioksidativne učinkovitosti ekstraktov, nista pokazali linearne povezanosti. Morda zato, ker sta reakciji med fenolnimi spojinami in DPPH[•] oziroma železovimi ioni delovali z različno hitrostjo ali pa po dveh različnih reakcijskih poteh; pri deaktiviranju DPPH[•] radikala je lahko prevladoval mehanizem prenosa H-atoma, pri redukciji železovega iona pa prenos elektrona.

Ugotovili smo, da imajo vsi ekstrakti antioksidativno učinkovitost, in statistično dokazali, da je njihovo delovanje odvisno od skupne vsebnosti fenolnih spojin, kot so TyrOH, DMO-Agl-dA, O-Agl-A in Tyr, DML-Agl-dA, L-Agl-A.

Statistično smo dokazali, da sorta ne vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin, ampak na vsebnost določenih fenolnih spojin (DML-Agl-dA, lignane, O-Agl-A, L-Agl-A, apigenin in neassignirane fenolne spojine). Poleg tega sorta oljk ne vpliva na antioksidativno učinkovitost ekstraktov, ki smo jo določili z omenjenima metodama.

Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna pozitivna povezava med fenolnimi spojinami, kjer je še posebej zanimiva korelacija med vsebnostjo TyrOH in Tyr ter med vsebnostjo DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA, luteolina ter asigniranimi fenolnimi spojinami.

7 VIRI

- Abdel - Hameed. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*, 114: 1271–1277.
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573–589.
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–32.
- Bandelj Mavsar D., Bešter E., Bučar - Miklavčič M., Butinar B., Čalija D., Kanjur Ž. Levanič T. Valenčič V. Mazi Ž. 2005. ABC o 'Istrski belici'. Koper, Univerza na Primorskem Znanstveno-raziskovalno središče, Labs d.o.o.: 16 str.
- Bešter E. 2007. Oksidacijska stabilnost ekstra deviških oljčnih olj Slovenske Istre. Doktorska disertacija. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 5–12.
- Bešter E., Butinar B., Bučar - Miklavčič M., Golob T. 2008. Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry*, 108: 446–454.
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 208–212, 432–432.
- Briante R., Patumi M., Terenziani S., Bismuto E., Febbraio F., Nucci R. 2002. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4934–4940.
- Bučar - Miklavčič M., Butinar B., Jančar M., Sotlar M., Vesel V. 1997. Oljka in oljčno olje. Ljubljana, Kmečki glas: 5–29, 116–124.
- Bučar - Miklavčič M., Butinar B., Čalija D., 2006. ABC o oljčnem olju. Koper, Univerza na Primorskem Znanstveno-raziskovalno središče, Labs d.o.o: 12 str.
- Bučar - Miklavčič M. 1999. Oljčno olje. Primorska srečanja: Revija za družboslovje in kulturo, 23, 214: 115–116.
- Bučar - Miklavčič M., Dujc V., Hlaj A. 2004. Elaborat za postopek priznanja označbe geografskega porekla 'Ekstra deviško oljčno olje Slovenske Istre': Potrjena specifikacija za označbo geografskega porekla 'Ekstra deviško oljčno olje slovenske Istre: 324-01-7/2002/27: Izola, Društvo Oljkarjev Slovenske Istre: 38 str.
- Butinar B., Bučar - Miklavčič M., Čalija D. 1999a. Polifenoli v oljčnih oljih Slovenske Istre letnika 94. *Annales Series Historia Naturalis*, 9: 17–26.
- Butinar B., Bučar - Miklavčič M., Čalija D. 1999b. Skupni polifenoli hidroksitrosol in tirosol v oljčnih oljih Slovenske Istre v dveh zaporednih letih (1996, 1997). *Annales Series Historia Naturalis*, 9: 27–36.

- Butinar B., Bučar - Miklavčič M., Čalija D. 1999c. Tokoferoli v oljčnih oljih Slovenske Istre v treh zaporednih. *Annales Series Historia Naturalis*, 9: 37–45.
- Butinar B., Bučar - Miklavčič M. 2000. Tocoferoli in polifenoli v oljčnih oljih Slovenske Istre. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77–91.
- Butinar B., Bučar - Miklavčič M., Čalija D., Bešter E. 2004. Spremljanje maščobno kislinske sestave oljčnih olj Slovenske Istre v letih 1992–2002. V: Zbornik referatov 1. Slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 24. –26. marec 2004. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo: 711–716.
- Butinar B. 2001. Prehranski oksidanti v oljčnih oljih slovenske Istre. *Herbika: revija o pridelavi predelavi in uporabi zdravilnih rastlin*, 2: 24–28.
- Cicerale S., Conlan X. A., Sinclair A.J., Keast R.S.J. 2009. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 218–236.
- Cenčič L., Grašek V., Marechal A.L. 2006. Slovenski zaščiteni posebni kmetijski pridelki oziroma živila. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije: 10–10, 15–16.
- COI. 2006. COI/T.15/NC no. 3, Rev. 2, 24 November 2006. Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. Madrid, International Olive Council, COI–Consiglio oleicolo internazionale: 16 str.
- Cortesi N., Rovellini P., Fusari P. 2002. Dosaggio dei biofenoli degli oli vergini di oliva: idrossitirosolo e tirosolo, agliconi secoiridoidi, acidi secoiridoidi, lignani e flavonoidi. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79: 145–150.
- Društvo Oljkarjev Slovenske Istre. 2006. Ekstra deviško oljčno olje z geografskim poreklom. Koper, DOSI–Društvo Oljkarjev Slovenske Istre: zloženka.
- Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by 'ferric reducing antioxidant power' assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721: 174–184.
- Foti M.C., Daquino C., Geraci C. 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69: 2309–2314.
- Gorinstein S., Martin - Beloso O., Katrich E., Lojek A., Čiz M., Gligelmo - Miguel N., Haruenkit R., Park Y.S., Jung S.T., Traktenberg S. 2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 154–159.

- Guetierrez F., Villafranca M.J., Castellano J.M. 2002. Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 97: 669–676.
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 11: 966–968.
- Halliwell B. 1991. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. V: Free radicals and food additives. Okezie I.A., Halliwell B. (eds.). London, Taylor & Francis: 37–49.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841–1856.
- Klofutar C. 1992. Fizikalno kemiske lastnosti triacilglicerolov. V: Lipidi. 14. Bitenčevi dnevi, Ljubljana 4. in 5. junij 1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11–16.
- Kulusic T., Radonic R., Katalinic V., Milos M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative acitivity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85: 633–640.
- Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Cod'sson J. D., Rinaldi M., Arlorio M. 2009. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 144: 889–897.
- Mateos R., Dominguez M. M., Espartero J. L., Cert A. 2003. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7170–7175.
- Montedoro G., Servilli M., Baldioli M., Miniati E. 1992. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1571–1578.
- Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M., Katzogiannos E. 2004. Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61: 155–160.
- Papadimitriou V., Sotiroudis T. G., Xenakis A., Sofikiti N., Stavyiannoudaki V., Chaniotakis N.A. 2006. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Analytica Chimica Acta*, 573–574: 453–458.
- Papadopoulos K., Triantis T., Yannakopoulou E., Nikokavoura A., Dimotikali D. 2003. Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oil using chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 494: 41–47.
- Pirisi F. M., Cabras P., Falqui Cao P., Migliorini M., Muggelli M. 2000. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction HPLC separation and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1191–1196.

- Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290–4302.
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprocеси придобivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53–65.
- Rice - Evans C. A., Miller J. N., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 4: 152–159.
- Rodošek L. 2001. Deviškost še nič ne pomeni. *Herbika: revija o pridelavi predelavi in uporabi zdravilnih rastlin*, 2: 20–23.
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235–254.
- Rovellini P., Cortesi N. 2002. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycones in virgin olive oil: Aldehydic dialdehydic forms and their oxidized products. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79, 1–2: 1–14.
- Rudan - Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E, in koencim Q₁₀. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39–51.
- Rudan - Tasič D., Klofutar C. 2007. Kromatografija. V: Fizikalno kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo Ljubljana: 23–51.
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147–176.
- SAS Software. Version 8. 01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software.
- Tsimidou M., Blekas G., Boskou D. 2003. Olive oil. V: Encyclopedia of food sciences and nutriton. Vol. 7. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M.(eds.). Amsterdam, Academic Press: 4252–4260.
- Uredba komisije (EGS) št. 2568/91 z dne 11. julija 1991 o značilnostih oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter o ustreznih analiznih metodah. 1991. Uradni list Evropske Unije, L 248: 368–452.
- Valenčič V. 2004. Vrednotenje kakovosti deviškega oljčnega olja. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 8–8, 19–19.

- Velasco J., Andersen M. L., Skibsted L. H. 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency of radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85: 623–632.
- Vidakovič S. 2005 Prehransko fiziološka kakovost in oksidacijska stabilnost rastlinskih olj. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 29–42.
- Vidrih P.V. 2004. Oljka in olje v Antiki. *Annales Series Historia et Sociologia*, 14: 243–256.
- Vesel V., Valenčič V., Jančar M., Čalija D., Butinar B., Bučar – Miklavčič M. 2009. Oljka – živilo, zdravilo, lepotilo. Ljubljana, ČZD Kmečki glas d.o.o.: 141 str.
- Viola P. 1997. L'olio di oliva e la salute. Madrid, COI–Consiglio Oleicolo Internazionale: 5–5.
- Wong C. C., Li H.-B., Cheng K. W., Chen F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 705–711.
- Woolard D. C., Indyk H.E. 2003. Tocopherols: Properties and determination. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 9. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M.(eds.). Amsterdam, Academic Press: 5789–5796.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici dr. Heleni Abramovič, za čas, pomoč in strokovno kritiko med pisanjem diplome in pri pregledovanju zaključenega dela.

Zahvalila bi se dr. Lei Gašperlin, za pomoč pri statistični obdelavi podatkov in recenzentki prof. dr. Tereziji Golob za končni pregled diplomske naloge.

Zahvalila bi se Mileni Bučar-Miklavčič, Vasiliju Valenčiču, Bojanu Butinarju ter celotnemu kolektivu v laboratoriju LABS d. o. o., za izbor oljčnega olja, analize, ki sem jih lahko opravila v njihovih prostorih, za čas in za posredovane strokovne nasvete, ki so mi jih nudili med pisanjem diplomskega dela.

Zahvaljujem se Petri Terpinc uni. dipl. inž. živ. tehn. za pomoč pri izvajanju analiz.

Zahvaljujem se tehničnima sodelovkama ge. Jani Martinuč in ge. Mileni Žabkar za pomoč pri delu v laboratoriju.

Ob teji priložnosti bi se zahvalila moji družini, ki mi je tekom študija stala ob strani in me podpirala na moji poti do diplome.