

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maruša LAMUT

***In vitro* TER *in vivo* ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST
METANOLNIH EKSTRAKTOV EKSTRA DEVIŠKIH OLJČNIH OLJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

***In vitro* AND *in vivo* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC
EXTRACTS OF EXTRA VIRGIN OLIVE OILS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biokemijo in kemijo živil in Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Abramovič, za somentorico doc. dr. Polono Jamnik in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Somentorica: doc. dr. Polona Jamnik

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maruša Lamut

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 664.34:634.63:577.115(043)=163.6
KG rastlinska olja/oljčna olja/ekstra deviška oljčna olja/*Olea europaea*/metanolni ekstrakti/fenolne spojine *in vitro* antioksidativna učinkovitost/*in vivo* antioksidativna učinkovitost/*Saccharomyces cerevisiae*
AV LAMUT, Maruša
SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/JAMNIK, Polona (somentorica)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2010
IN *In vitro* TER *in vivo* ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST METANOLNIH EKSTRAKTOV EKSTRA DEVIŠKIH OLJČNIH OLJ
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 59 str., 17 pregl., 14 slik, 51 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V sklopu diplomskega dela smo ekstrahirali fenolne spojine (FS) iz ekstra deviških oljčnih olj. Na metanolnih ekstraktih smo izvedli *in vitro* ter *in vivo* določitev antioksidacijskega potenciala ekstraktov. Določili smo koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih (Folin-Ciocalteu metoda) ter jo primerjali z rezultati analize HPLC (kvalitativna in kvantitativna ocena FS v vzorcih). *In vitro* antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo raziskali s tremi metodami (analiza sposobnosti lovljenja radikalov-DPPH[•] metoda, sposobnost redukcije kovinskih ionov in določitev antioksidativne učinkovitosti v vodni emulziji linolne kisline); *in vivo* antioksidativno učinkovitost pa z metodo določanja znotrajcelične oksidacije v kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* z uporabo barvila diklorofluorescein. Vsi ekstrakti so *in vitro* pokazali antioksidativno učinkovitost, vendar se je le ta razlikovala glede na metodo določitve, medtem ko je bilo v *in vivo* pogojih z izjemo enega, za vse ekstrakte pokazano prooksidativno delovanje. Izkazalo se je, da so rezultati o antioksidativni učinkovitosti pri *in vitro* raziskavah le deloma pokazali pozitivno povezavo z antioksidativno učinkovitostjo v *in vivo* okolju. Izkazalo se je tudi, da sestava FS v vzorcu vpliva na antioksidativno učinkovitost ter da je učinkovitost odvisna od testnega sistema (*in vitro* ali *in vivo*).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 664.34:634.63:577.115(043)=163.6
CX oils vegetable/olive oils/extra virgin olive oils/*Olea europaea*/methanol extracts/phenolic compounds/*in vitro* antioxidant efficiency/*in vivo* antioxidant efficiency/ *Saccharomyces cerevisiae*
AU LAMUT, Maruša
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2010
TI *In vitro* AND *in vivo* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS OF EXTRA VIRGIN OLIVE OILS
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 59 p., 17 tab., 14 fig., 51 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In graduation thesis extracted phenolic compounds from extra virgin olive oils have been studied. Various *in vitro* and *in vivo* assays with methanol extracts to determine their antioxidant efficiency were performed. The concentration of phenolic compounds (Folin – Ciocalteu method) were determined and compared with the results from HPLC analysis (qualitative and quantitative evaluation of phenolic compound). *In vitro* antioxidant effectiveness of these extracts were tested by three methodes (DPPH• method, the ability to reduce Fe³⁺ ion and β-carotene bleaching assay) while the intracellular oxidation in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using diclorofluorescein (H₂DCF) was tested *in vivo* All extracts showed antioxidant efficiency *in vitro*, but the range of efficiency differed accoeding to the method . With the exception of one, all extracts tested in yeast cells showed pro-oxidative action. Our resoult show that methanol extracts which had high efficiency *in vitro* conditions were not good in protecting yeast cell against damages caused by reactive oxygen species. In addition, it has been shown that the presence of specific phenolic compounds affects on antioxidant efficiency of the extract and that some phenolic compounds are more effective *in vitro* and some *in vivo*.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KDW).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	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	3
2.2 OLJČNO OLJE.....	4
2.3 FENOLNE SPOJINE.....	5
2.3.1 Delitev fenolnih spojin.....	6
2.3.2 Fenolne spojine v oljčnem olju	6
2.3.3 Vloga fenolnih spojin v oljčnem olju	8
2.4 ANTIOKSIDANTI.....	9
2.4.1 Mehanizem delovanja antioksidantov na primeru lipidne peroksidacije	10
2.4.2 Antioksidanti v prehrani in njihovo preprečevanje nastanka bolezni.....	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Oljčno olje	13
3.1.2 Reagenti in pribor uporabljeni pri in vitro metodah	15
4 METODE	18
4.1 METODE ZA <i>in vitro</i> ANALIZE	18
4.1.1 Ekstrakcija	18
4.1.2 Določitve vsebnosti skupnih fenolnih spojin: Folin – Ciocalteu metoda	18
4.1.2.1 Priprava umeritvene krivulje	19
4.1.3 Analiza sposobnosti redukcije	20

4.1.4	Analiza DPPH [•]	20
4.1.5	Beljenje β-karotena	21
4.2	METODA ZA <i>in vivo</i> ANALIZO	21
4.2.1	Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovkah <i>Saccharomyces cerevisiae</i> z uporabo barvila diklorofluorescein (H ₂ DCF)	21
4.3	STATISTIČNA ANALIZA	25
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	26
4.1	FENOLNE SPOJINE V EKSTRAKTIH VZORCEV EKSTRA DEVIŠKIH OLJČNIH OLJ	26
4.2	SPOSOBNOST REDUKCIJE	32
4.3	ANALIZA DPPH [•]	35
4.4	BELJENJE B-KAROTENA	39
4.5	DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE (<i>in vivo</i>) V KVASOVKAH <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Z UPORABO BARVILA DIKLOROFLUORESCEIN... ..	44
4.6	PRIMERJAVA REZULTATOV <i>in vitro</i> TER <i>in vivo</i> ANALIZ	47
5	SKLEPI	51
6	POVZETEK	53
7	VIRI	54
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razdelitev fenolnih spojin po skupinah (Balasundram in sod., 2006).....	6
Preglednica 2: Primerjava vsebnosti posameznih fenolnih spojin v mg/kg oljčnih olj.....	7
Preglednica 3: Strukturne formule FS v oljčnem olju (Tuck in Hayball, 2002); (Vissere, 2004); (Ryan in sod., 2002); (Bendini in sod., 2007); (Trans-2hexanal ... , 2008).....	8
Preglednica 4: Opredelitev vzorcev po sorti	13
Preglednica 5: Vsebnost posameznih in skupnih fenolnih spojin, ki so podane v mg/kg olja in določene z metodo HPLC v okviru širše raziskave, ki jo je opravila z namenom priprave diplomskega dela Nika Slokar	14
Preglednica 6: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993).....	16
Preglednica 7: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993).....	16
Preglednica 8: Volumen (V) izhodne raztopine galne kisline, masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{g.k.}$) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{765}).....	19
Preglednica 9: Volumni ekstrakta oljčnega olja, ki smo jih dodali suspenziji celic.....	22
Preglednica 10: Preglednica koncentracij v brozgi.....	23
Preglednica 11: Razporeditev vzorcev na mikrotiterski plošči.....	24
Preglednica 12: Vsebnost fenolnih spojin določena z Folin-Ciocalteu metodo.....	26
Preglednica 13: Vsebnost razgradnih produktov ligstrozida in olevropeina v preiskovanih vzorcih.....	30
Preglednica 14: Koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{740}) ter koeficient sposobnosti redukcije (C_R) metanolnih ekstraktov EDOO.....	33

Preglednica 15: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež ulovljenega radikala DPPH [•] v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije.....	37
Preglednica 16: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{470}) za metanolne ekstrakte EDOO pri različnih časih inkubacije (t) ter koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji.....	40
Preglednica 17: Rezultati meritev fluorescenčne intenzitete.....	45

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Oljka (<i>Olea europea sativa</i>).....	3
Slika 2: Oljčno olje	4
Slika 3: Umeritvena krivulja z galno kislino.....	19
Slika 4: Odvisnost vsebnosti FS določenih z metodo HPLC od vsebnosti FS določenih z metodo Folin – Ciocalteu.....	28
Slika 5: Vsebnost posameznih FS, ki je podana kot masni delež spojine (%) glede na vsebnost skupnih FS določenih z metodo HPLC.....	31
Slika 6: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (prikaz za dva vzorca OL-08 in OL-10) določena z metodo FRAP (redukcijska sposobnost).....	34
Slika 7: Koeficient sposobnosti redukcije (C_R) za metanolne ekstrakte EDOO.....	35
Slika 8: Delež ulovljenega radikala DPPH [•] v reakcijski zmesi po 30 minutni inkubaciji za metanolne ekstrakte EDOO.....	38
Slika 9: Odvisnost vrednosti C_{AA} od časa za metanolne ekstrakte EDOO.....	42
Slika 10: Koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji po 120 min za metanolne ekstrakte EDOO pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL.....	43
Slika 11: Prikaz izmerjenih fluorescenčnih intenzitet za metanolne ekstrakte EDOO.....	46
Slika 12: Odvisnost izmerjene intenzitete fluorescence (RFU) od deleža ulovljenega radikala DPPH [•] (% DPPH) za metanolne ekstrakte EDOO.....	48
Slika 13: Odvisnost fluorescence od koeficienta sposobnosti redukcije (C_R) za metanolne ekstrakte EDOO.....	49
Slika 14: Odvisnost fluorescence od koeficienta antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji za metanolne ekstrakte EDOO.....	50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH – antioksidant

AOP - antioksidativni potencial

C_{AA} – koeficient antioksidativne učinkovitosti

C_R – koeficient redukcije

DML-Agl-dA - dialdehidna oblika dekarboksimetil ligstrozid aglikona

DMO-Agl-dA - dialdehidna oblika dekarboksimetil olevropein aglikona

DPPH[•] - 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

EDOO - ekstra deviško oljčno olje

F-C - Folin - Ciocalteu

FS - fenolne spojine

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

L-Agl-dA - dialdehidna oblika ligstrozid aglikona

MetOH - metanol

O-Agl-dA - dialdehidna oblika olevropein aglikona

R[•] - radikal

RH - maščobna kislina

ROOH[•] - peroksilni radikal

ROOH – peroksid

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

Try – tirozol

TyrOH - hidroksitirozol

γ - masna koncentracija

1 UVOD

Dokazano je, da rastline sintetizirajo številne sekundarne metabolite, med katere spadajo tudi fenolne spojine (FS). FS imajo največ en aromatski obroč in najmanj eno ali več OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. K veliki antioksidacijski učinkovitosti pripomorejo prav OH skupine, ki imajo čim šibkejšo vez A-H. Naloga antioksidantov v človeških, živalskih in rastlinskih celicah je preprečevanje oksidativnega stresa kateremu so le-te neprestano izpostavljene. Te spremembe so lahko eksogenega in endogenega izvora. Endogenega izvora so nekateri procesi v mitohondrijih, endoplazmskem retikulumu, peroksisomih, citoplazmi in celični membrani, eksogenega izvora pa so ionizacijsko sevanje, ozon, visoke temperature, itd.

Oksidativni stres je posledica povečane produkcije reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kamor sodijo tudi prosti radikali. Prosti radikali reagirajo namreč z lipidi, beljakovinami in DNA v procesu oksidacije in jih spreminjajo. Zaradi teh sprememb povzročajo težave v organizmih kot tudi v živilih. Znano je, da so ROS povezane s staranjem in z razvojem kroničnih bolezni, kot so ateroskleroza, rak, diabetes,..., v živilih pa povzročajo težave predvsem zaradi oksidacije prostih maščobnih kislin, pri čimer živila postanejo žarka. S prisotnostjo fenolnih antioksidantov v živilu pa le ti zaustavijo oksidacijo, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom.

Nekateri antioksidanti, ki so eksogenega izvora, so nujno potrebni za življenje (npr. askorbinska kislina, selen). Ravno iz tega razloga se zadnja leta veliko raziskuje učinek antioksidantov na človeški organizem. Ugotavlja se učinkovitost in pozitivni učinki na zdravje s prehrano in prehranskimi dopolnili zaužitih antioksidantov.

98-99% oljčnega olja sestavljajo triacilgliceroli, ostali del pa predstavlja množica sestavin, npr. steroli, tokoferoli, fenolne spojine, itd. Fenolne spojine dajejo temu prehranskemu izdelku funkcionalne lastnosti. So pomembne sestavine olja tako z organoleptičnega vidika kot z vidika biološke vrednosti, določajo življenjsko dobo olja in veljajo kot parameter kakovosti tega olja.

Eden od pogojev za razumevanje antioksidacijske aktivnosti FS v *in vivo* okolju je sigurno kemijska karakterizacija teh spojin. Po pridobitvi teh informacij pa si lahko pomagamo pri razumevanju antioksidativnega potenciala posamezne fenolne spojine. Za *in vitro* določitev antioksidacijskega učinka preiskovanega vzorca obstaja mnogo metod manj pa je takih, ki bi potrdile *in vitro* rezultate v *in vivo* pogojih. V primeru tega diplomskega dela pa nas bo najbolj zanimala prav korelacija med *in vitro* ter *in vivo* pridobljenimi rezultati.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomske naloge smo želeli iz določenega števila izbranih vzorcev ekstra deviških oljčnih olj pridobiti metanolne ekstrakte fenolnih spojin in v pripravljenih ekstraktih določiti vsebnost fenolnih spojin. Prav tako smo želeli določiti v različnih modelnih sistemih *in vitro* ter na modelu celice (*in vivo*) antioksidativno učinkovitost metanolnih ekstraktov in na podlagi pridobljenih rezultatov raziskati korelacijo med antioksidativnim učinkom *in vitro* ter *in vivo*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da obstaja pozitivna korelacija med antioksidativnim učinkom *in vitro* ter učinkom določenim *in vivo*. Pričakujemo tudi, da je antioksidativni učinek *in vitro* oziroma *in vivo* odvisen od vsebnosti posamezne fenolne spojine v ekstraktu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OLJKA

Oljka spada v red Oleales in edino družino tega reda Oleaceae. Gojena oljka se imenuje *Olea europaea sativa*. Ima lahko eno ali več debel, zraste od 3 do 15 metrov visoko sama višina drevesa pa je odvisna od obrezovanja, sorte, okolja, itd.. Drevo je zimzeleno s suličastimi listi, ki so nasprotno razporejeni, le ti se na drevesu obdržijo približno tri leta. Prekriva jih debela povoščena povrhnjica, kar poleg široko razraslih korenin oljki omogoča življenje v krajih z malo padavin.

Oljka *Olea europea*, kakršno jo danes poznamo je uspevala že 6000 do 7000 let pr.n.št. v zemljepisnem loku med Malo Azijo, Bližnjim vzhodom in severovzhodnim delom Afrike. V svetu je skupno približno 800 milijonov oljk, od tega približno 650 milijonov rodnih dreves. Večino dreves in proizvodnje ter predelave plodov oljke pokrijejo dežele Sredozemskega morja (Španija, Italija, Grčija, Portugalska, Tunizija, Alžir, Maroko, Turčija, Sirija). Kar 88% oljčnega olja pridelajo Španija, Italija, Grčija, Tunizija in Turčija. V zadnjem času pa se oljarstvo zelo hitro razvija v Ameriki in Avstraliji (Bučar-Miklavčič in sod., 1997).



Slika 1: Oljka (*Olea europaea sativa*)

V Slovenski Istri je bilo leta 2009 z oljčnimi drevesi zasajenih približno 837 hektarov površine kar predstavlja približno 199.000 oljčnih dreves v tem letu, je bilo pridelanih okoli 2.284 ton oljk ali od 411 do 502 ton oljčnega olja (SI-Stat ... , 2009). V slovenskih oljčnih nasadih prevladuje sorta Istrska belica, poleg nje pa gojijo tudi naslednje sorte: Leccino, Pendolino, Ascolana trnera, Buga, Črnica, Fantoio, Picholine, Mata, Maurino, Štorta, Oblica.

2.2 OLJČNO OLJE

Priporočeni mednarodni standard za oljčno olje CAC/RS 33-1981 (Rev. 2-2003) opredeljuje oljčno olje kot (Codex - standard ..., 2003):

- Oljčno olje je olje pridobljeno iz sadeža oljke (*Olea europaea L.*) brez kakršnih manipulacij ali posegov, ki niso deklarirani ter brez mešanja z katerimkoli drugim oljem.
- Deviško oljčno olje iz sadeža oljke je pridobljeno samo z mehanskim ali drugim fizikalnim postopkom pod pogoji, predvsem temperaturnimi pogoji, ki ne povzročajo spremembe olja. Dovoljeni postopki med pridelavo so pranje, dekantiranje, centrifugiranje in filtracija.
- Ekstra deviško oljčno olje: je deviško oljčno olje, ki ima vsebnost prostih maščobnih kislin nižjo od 0,8 g na 100 gramov olja. V Ur.l. RS, št. 30/1999 je dovoljena vsebnost prostih maščobnih kislin v EDOO do največ 1 %.



Slika 2: Oljčno olje

Oljčno olje iztisnejo iz plodov z različnimi postopki. Oljkam razbijejo celične stene v oljčno drozgo, iz katere se izceja oljčni mošt. Iz mošta nato ločijo olje in odvečno vegetacijsko (rastlinsko) vodo.

Predelava plodov poteka v naslednjih fazah:

- čiščenje plodov (odstranjevanje listov, drugih mehanskih primesi in pranje plodov).
- mletje in drobljenje – V oljčnih celicah so oljne kapljice premera 5-10 mikronov. Z mletjem razbijemo celične stene, ki zavirajo izstop olja iz celic plodu. Oljne kapljice, ki izstopijo se pričnejo združevati in postajajo čedalje večje.

Poznamo več metod mletja: mletje z mlinskimi kamni, drobilniki s kladivi in drobilniki z vrtljivimi valji.

- mesenje – pospeši izločanje mošta in ločevanje olja od vegetacijske vode. Z mesenjem povečamo izkoristek (pridobitek tudi do 15 % olja) kar poveča zmogljivost stiskalnic.

- izločanje oljnega mošta iz drozge ali ekstrakcija – Za ekstrakcijo se uporabljata dva postopka: hidravlične stiskalnice in kontinuirane centrifuge. Iz drozge separiramo tri frakcije: olje, izpiralno vodo in tropine. Tropine se običajno posušijo in ponovno ekstrahirajo s topilom (Bučar-Miklavčič in sod., 1997).

Oljčno olje vsebuje pretežno triacilglicerole, v manjših količinah pa vsebuje negliceridne snovi oziroma neumiljive sestavine. Teh je od 0,5 do 1,0 % (drugi viri navajajo tudi do 1,5 % (Butinar, 2001).

Med neumiljive komponente, ki so prisotne v oljčnem olju štejemo: v maščobah topne vitamine A, D, E, K; fenolne spojine (Bučar-Miklavčič, 2001); skvalen (biokemijski prekursor za holesterol), steroli, pigmenti (klorofil, karotenoidi), hlapne spojine. Poudariti je potrebno da največ neumiljivih snovi vsebujejo olja, ki niso izpostavljena procesu rafinacije, med katera spada DOO, ostala olja med procesom rafinacije izgubijo znaten delež neumiljivih snovi. Prav tako dajejo te spojine značilno aromo EDOO (trans 2-heksanal – aroma po sveže pokošeni travi).

2.3 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine definiramo kot tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več –OH skupinami in zato se je uveljavilo tudi drugo ime - polifenoli (Abram in Simčič, 1997). FS so sekundarni metaboliti in zelo heterogena skupina organskih spojin, ki v rastlinskem svetu opravljajo funkcijo barvil, koencimov, odvrtačal, protimikrobnih agensov in fitoaleksinov (spojine, ki se pojavljajo v rastlinah kot odgovor na infekcije). FS dajejo rastlinam karakterističen okus, prehransko vrednost, farmakološke in toksične učinke. V rastlinah se FS redko pojavljajo proste, največkrat so vezane na sladkorje, amino skupine, lipide in terpenoide (Donko, 1995).

Biosinteza nekaterih FS in akumulacija sekundarnih metabolitov je endogeno kontroliran proces med diferenciacijo (razvojem) rastline, ki je pogojen z vrsto rastline. Vsebnost FS v posameznih delih rastline se med sabo razlikuje. Na proces biosinteze vplivajo tudi različni eksogeni dejavniki: podnebne razmere (temperatura, količina padavin), svetloba (predvsem UV), poškodbe, okužbe in ostale stresne okoliščine (Häkkinen, 2000) ter rastišče (vsebnost hranljivih snovi v zemlji) (Häkkinen in sod., 1999).

2.3.1 Delitev fenolnih spojin

Skupina FS je zelo kompleksna skupina organskih spojin, zato se za poimenovanje priporoča uporaba razdelitev po številu C atomov v molekuli, kot je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Razdelitev fenolnih spojin po skupinah (Balasundram in sod., 2006)

Skupine	Struktura
Preprosti fenoli, benzokinoni	C_6
Hidroksibenzojske kisline	$C_6 - C_1$
Fenilacetne kisline	$C_6 - C_2$
Hidroksicimetne kisline, fenilpropeni (kumarini, izokumarini)	$C_6 - C_3$
Naftokinoni	$C_6 - C_4$
Ksantoni	$C_6 - C_1 - C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Lignini	$(C_6 - C_3)_n$
Kondenzirani tanini (proantocianidini ali flavanoli)	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

2.3.2 Fenolne spojine v oljčnem olju

V zadnjih 20 letih so identificirali in kvantitativno ovrednotili večino polarnih FS v deviškem oljčnem olju. Te fenolne spojine so: fenolne kisline; preprosti fenoli (npr. tirozol (Try) in hidroksitirozol (TryOH)); sekoiridoidni derivati glikozidov (npr. olevopein in ligstrozid); lignani; flavonoidi (luteolin in apigenin (Bandelj in sod., 2005)) in hidroksil-izokromati (Boskou, 2008). Poleg naštetih pa avtor Batino (1999) omenja še fenolne alkohole (npr. 3,4-(dihidroksifenil) etanol (3,4-DHPEA) in *p*-(hidroksifenil)

etanol (*p*-HPEA)) in antociane (npr. cianidin).

Posamezne spojine od naštetih FS so pretvorbeni produkti bolj kompleksnih spojin, ki jih oljka tvori v času rasti in dozorevanja plodov. Znano je, da med rastjo, predelavo svežih plodov oljk, pridobivanjem in skladiščenjem olja iz olevropeina in ligstrozida preko določenih pretvorbene - reakcijskih poti nastanejo različni produkti. Pretvorbene oblike dveh glavnih sekoiridoidnih glukoizidov oljčnih plodov - ligstrozida in olevropeina dajejo OO značilno aromo in okus (Bandelj in sod., 2005). Molekula ligstrozida je sestavljena iz treh komponent: na enolno kislino (sekoiridoid) sta vezana tirosol (fenol) in glukoza (monosaharid). Sestava olevropeina je podobna, od ligstrozida se razlikuje le fenolni del molekule, ki je v tem primeru ortodifenol hidroksitirosol (Ryan in sod., 2002).

Strukturne formule spojin, ki prevladujejo v sestavi FS oljčnega olja, so prikazane v preglednici 3.

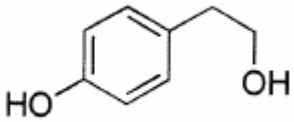
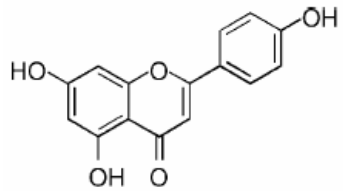
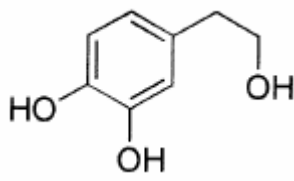
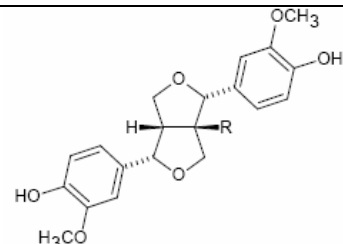
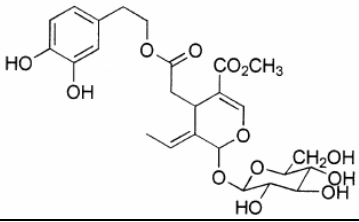
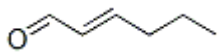
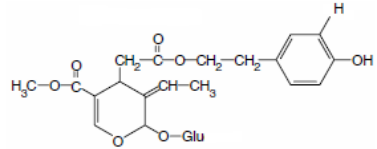
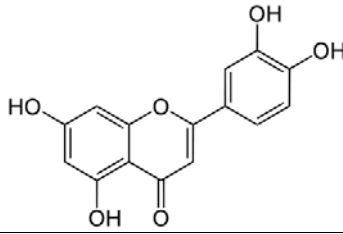
Na koncu pretvorbene poti je vsebnost skupnih FS lahko še relativno visoka, vendar je olje že pusto in ponavadi tudi antioksidativno šibko, saj v nejm prevladuje tirosol, ki nima antioksidativnih učinkovitosti (Bandelj in sod., 2005).

V literaturi smo zasledili naslednje informacije o vsebnosti FS v oljčnih oljih, ki so bile določene z HPLC metodo. Murkovic in sod. (2004) so v vzorcih OO določili največ tirosola od 1,4 do 29 mg/kg olja, luteolina v koncentracijah od 0,22 do 7,0 mg/kg, apigenina pa od 0,68 do 1,6 mg/kg. Kot zanimivost pa navaja, da njegovi vzorci niso vsebovali olevropeina, ki je v OO ponavadi prisoten v koncentraciji do 11 mg/kg olja. Avtor Boscou (2008) navaja, da so lignani v OO prisotni v koncentracijah od 112 do 275 mg/kg olja, hidroksitirosol v koncentracijah od 21 do 131 mg/kg olja, luteolin v koncentracijah okoli 10 mg/kg olja za grška OO pa navaja, da je luteolin prisoten v koncentracijah od 0,2 do 7 mg/kg olja. Avtorica Bešter pa navaja vsebnosti tirosola od 3,4 do 22,7 mg/kg, hidroksitirosola od 2,8 do 16,8 mg/kg, luteolin od 2,7 do 3,8 mg/kg, apigenin od 1,0 do 2,1 mg/kg ter lignani od 43,9 do 36,4 mg/kg EDOO.

Preglednica 2: Primerjava vsebnosti posameznih fenolnih spojin v mg/kg oljčnih olj

Fenolne spojine	Murkovic in sod. (2004)	Boskou (2008)	Bešter in sod. (2008)	Butinar (1999)	Bandelj in sod. (2005)	Nissiotis in Tasioula-Margari (2002)
Tyr	1,4 – 29,0	/	3,4 – 22,7	4,2 – 57,0	/	70,99 – 105,42
TyrOH	/	21,0 – 131,0	2,8 – 16,8	0,0 – 54,2	/	9,59 – 80,96
DMO-Agl-dA	/	/	98,9 – 223,2	/	100,0 – 200,0	/
DML-Agl-dA	/	/	86,5 – 217,8	/	100,0 – 200,0	/
Lignani	/	112,0 – 275,0	11,4 – 43,9	/	30,0 – 80,0	/
O-Agl-A	/	/	16,6 – 50,2	/	10,0 – 100,0	/
L-Agl-A	/	/	7,7 – 28,1	/	11,0 – 100,0	/
Luteolin	0,2 – 7,0	0,2 – 10,0	2,7 – 3,8	/	4,0 – 5,0	/
Apigenin	0,7 – 1,6	/	1,0 – 2,1	/	1,5 – 2,5	/

Preglednica 3: Strukturne formule FS v oljčnem olju (Tuck in Hayball, 2002); (Vissere, 2004); (Ryan in sod., 2002); (Bendini in sod., 2007); (Trans-2hexanal ... , 2008); (Luteolin ... , 2008)

Spojina	Strukturna formula	Spojina	Strukturna formula
Tirosol		Apigenin	
Hidroksitirosol		Lignani	
Olevopein		Trans 2-heksanal (aroma po sveže pokošeni travi)	
Ligstrozid		Luteolin	

2.3.3 Vloga fenolnih spojin v oljčnem olju

V sestavi oljčnega olja prevladujejo triacilgliceroli (99,0 % do 99,5 %) (Tuck in Hayball, 2002) zaradi česar je olje izpostavljeno procesu avtooksidacije. Dvojne vezi v oljih in masteh predstavljajo aktivno mesto, kjer lahko poteče reakcija s kisikom. Ta reakcija vodi do nastanka primarnih, sekundarnih in terciarnih oksidacijskih produktov. Posledice lipidne peroksidacije se kažejo v poslabšanju senzoričnih lastnosti kot tudi v prehranski vrednosti olja. Lipidno peroksidacijo ali drugače avtooksidacijo pa najučinkoviteje preprečijo naravno prisotni antioksidanti v olju (fenolne spojine) (Frankel, 1996).

Večina FS prisotnih v oljčnem olju so antioksidanti. Prisotnost FS je pomembna za oksidacijsko stabilnost ekstra deviškega oljčnega olja med skladiščenjem in prav tako med toplotno obdelavo živil pri visokih temperaturah. Glavne fenolne spojine, ki so odgovorne za izjemno oksidacijsko rezistenco oljčnega olja, so dialdehidna oblika enolne kisline vezana na hidroksitirozol (3,4-DHPEA-EDA), dekarboksimetil oleuropein aglikon in hidroksitirozol. Medtem ko so tirozol, lignani in ligstrozidni aglikoni šibkejši antioksidanti.

Antioksidacijska sposobnost fenolov je okrepljena v prisotnosti tokoferolov, ta sinergizem pa je bolj očiten, ko je koncentracija fenolov relativno nizka. Ugotovljeno je bilo, da je učinkovitost tokoferolov lovljenju prostih radikalov v deviškem oljčnem olju 39 - 61 %. Iz tega sklepamo, da poleg fenolnih spojin antioksidacijsko učinkujejo tudi tokoferoli. V nekaterih raziskavah pa je bila predlagana tudi hipoteza, da luteolin in apigenin v nizkih koncentracijah v oljčnem olju delujeta kot sinergista pri lovljenju prostih radikalov (Visioli in sod., 2002).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Oksidativni stres je posledica porušenega ravnotežja med antioksidanti in ROS. Pojavi se v primeru, ko je bil sistem dlje časa izpostavljen oksidantom in če je ob tem prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma.

Kot posledica oksidativnega stresa se tvorijo naslednji prosti radikali: OH^\bullet (hidroksilni), HOO^\bullet (hidroperoksilni), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (hiperoksidni), RO^\bullet (alkoksidni), ROO^\bullet (alkilperoksilni), ArO^\bullet (fenoksilni) ali še drugi radikali.

Znano je, da prosti radikali reagirajo z lipidi, beljakovinami in DNA s čimer se spremeni kemijska struktura teh molekul, kar pa posledično vodi v inaktivacijo molekul ali propad le-teh (Abram, 2000). Zato je znano, da so ROS v močni povezavi s staranjem in z razvojem kroničnih bolezni, kot so diabetes, ateroskleroza, rak (več v poglavju 2.4.2).

Fenolne spojine preprečujejo oksidativni stres zaradi svoje antioksidacijske aktivnosti na različne načine. Npr.: z lovljenjem prostih radikalov, z vezavo kovinskih kationov ali z inhibicijo encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek ROS. Kako molekula antioksidanta prepreči oksidacijo, je odvisno od vrste antioksidanta.

2.4.1 Mehanizem delovanja antioksidantov na primeru lipidne peroksidacije

Proces avtooksidacije je radikalska verižna reakcija, torej se med procesom tvorijo spojine z neparnim elektronom – prosti radikali. Proces vsebuje tri osnovne faze:

- INICIACIJA - začetek,
- PROPAGACIJA - širjenje,
- TERMINACIJA - zaključek.

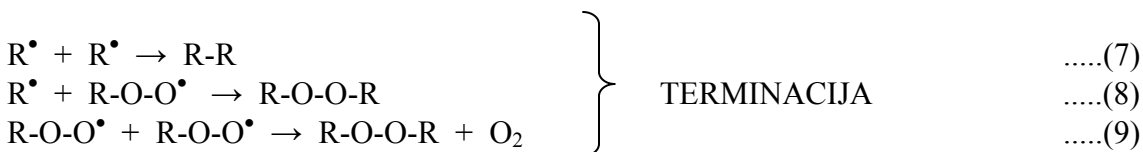
V procesu iniciacije se odcepi vodikov atom (H) iz maščobno kislinske verige (RH) in nastane radikal (R^\bullet).



V naslednji fazi propagacije se nastali radikal združi s kisikom in tvori se peroksidni radikal.



S terminacijo se reakcija zaključi, v tej fazi reagirajo med sabo radikali, tvorijo pa se nereaktivni produkti (Eskin in Przybylski, 2000).



Antioksidanti proces oksidacije preprečijo s tem, da se vključijo v fazo iniciacije ali propagacije. Antioksidant (A-H) reagira s peroksidnim radikalom, ki je nastal z oksidacijo lipida ($R-O-O^\bullet$), tvori se hidroperoksidna molekula ($R-O-OH$) in prosti radikal antioksidanta (A^\bullet).



Prosti radikal antioksidanta je relativno stabilen, obratna reakcija je zelo počasna. Prosti radikali antioksidanta ne inicirajo verižne reakcije avtooksidacije, razen če so prisotni v presežnih količinah

Antioksidanti reagirajo podobno z alkoksidnim prostim radikalom ($R-O^\bullet$), ki nastane med razgradnjo hidroperoksida.

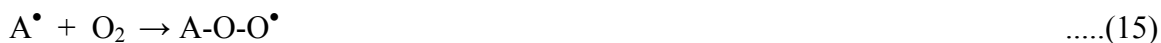


Znane so tudi sekundarne reakcije prostih radikalov antioksidanta; prosti radikal antioksidanta reagira z peroksidnim ali alkoksidnim radikalom nastane kopolimer (reakciji 12 in 13) ali reagira z drugim prostim radikalom antioksidanta (reakcija 14).

Na ta način se tvorijo dimeri ali trimeri, ki imajo zelo nizko antioksidacijsko sposobnost. Z aktivnostjo nekaterih sinergistov, kot je askorbinska kislina (C vitamin), je mogoče regenerirati prvotni antioksidant.



V reakciji s kisikom se prosti radikal antioksidanta pretvori v peroksidni antioksidantni radikal (A-O-O[•]):



Prosti radikal antioksidanta lahko prav tako reagira z nekaterimi labilnimi komponentami, kot so terpeni (R-H):



2.4.2 Antioksidanti v prehrani in njihovo preprečevanje nastanka bolezni

Znano je, da naj bi antioksidanti preprečevali nastanek naslednjih bolezni:

- rakavih obolenj (Pokorny, 2007)
- staranje (Pokorny, 2007)
- revmatoidni artritis (Halliwell, 1996)
- Parkinsonova bolezen (Halliwell, 1996)
- srčno-žilne bolezni

O pozitivnem vplivu antioksidantov na zaviranje srčno-žilnih bolezni je bilo objavljenih mnogo raziskav. Srčni napad se pojavi, kadar se koronarne arterije – majhne žile, ki napajajo srčno mišico s krvjo – zamašijo in ustavijo delovanje srca. Pri tem sta dejavna dva procesa: prvi je arterioskleroza – poapnenje žil, ki jo pospešuje visok krvni pritisk, preveč maščobe, kajenje in nepravilna prehrana. Drugi proces pa je tvorba krvnih strdkov, ki blokirajo dovod krvi do srca (Halliwell, 1996). Znano je, da prosti radikali, ki nastanejo kot posledica lipidne oksidacije, poškodujejo stene žil, lipoproteine in ostale snovi prisotne v krvi. Na lipoproteine se kovalentno vežejo in z njimi tvorijo fizično močno vez. Tako modificirane lipoproteine napadejo levkociti, ki jih prepoznajo kot tujke v krvnem obtoku. Levkociti jih absorbirajo in z njimi tvorijo gobaste celice. Te celice se nalagajo na stene žil, ki so bile poškodovane s prostimi radikali.

Na ta način se tvorijo aterosklerozni zamaški, ki povzročajo aterosklerozo (Pokorny, 2007). Maščobe v krvi prodrejo v poškodovano območje ter s tem povzročijo, da se zamaški še povečajo. Kajenje dodatno pospeši aterosklerozo, saj cigaretni dim vsebuje velike količine prostih radikalov (Halliwell, 1996).

S povečanjem koncentracije zaužitih antioksidantov v prehrani lahko preprečimo nastanek srčno-žilnih bolezni, kajti le-ti zmanjšajo koncentracijo ROS v krvi. V prehrano je potrebno dodati tako lipofilne (tokoferoli, karotenoidi) kot hidrofilne (askorbinska kislina) antioksidante.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Oljčno olje

Za analizo smo uporabili deset vzorcev ekstra deviškega oljčnega olja, ki smo jih dobili v laboratoriju LABS d.o.o., ki je akreditiran pri Slovenski akreditaciji po standardu SIST/ISO 17025. Vzorci so bili zamrznejni pri - 20°C in v taki obliki smo jih skladiščili do analiz.

Preiskovani vzorci oljčnega olja so proizvod stiskanja različnih oljarn z območja slovenske Istre. Olje je bilo pridobljeno iz oljk zraslih v sezoni 2007. Ekstra deviško oljčno olje je bilo pridobljeno iz različni sort oljk s postopkom hladnega stiskanja. Vzorci oljčnega olja so bili iztisnjeni iz plodov oljk sort Belica (BE), Leccino (L), en vzorec pa je bil mešanica sorte Belica, Karbonaca (K) in piranska Mata (MATA).

Preglednica 4: Opredelitev vzorcev po sorti

Vzorec EDOO	Sorta	Oljarna (datum stiskanja)
OL-01	Leccino	Hrvatini (23.10.2007)
OL-02	Belica	Agapito (9.11.2007)
OL-03	Leccino	Hrvatini (21.10.2007)
OL-04	Belica	Lisjak (18.10.2007)
OL-05	Leccino	Hrvatini (21.10.2007)
OL-06	Belica	Peroša (18.10.2007)
OL-07	Belica	Bajda (21.10.2007)
OL-08	Belica, Karbonaca, piranska Mata	Prinčič (21.10.2007)
OL-09	Leccino	Hrvatini (23.10.2007)
OL-10	Belica	Lisjak (15.11.2007)

Analiza HPLC je bila izvedena v Izoli v laboratoriju podjetja LABS d.o.o. v okviru širše raziskave, ki jo je opravila z namenom priprave diplomskega dela Nika Slokar. Pri HPLC analizi določitve vsebnosti posameznih FS v vzorcih EDOO so se osredotočili na naslednje fenolne spojine: TyrOH - hidroksitirozol, Tyr - tirozol, DMO-Agl-dA - dialdehidna oblika dekarboksimetil olevropein aglikona, DML-Agl-dA - dialdehidna oblika dekarboksimetil ligstrozid aglikona, O-Agl-A - dialdehidna oblika olevropein aglikona, L-Agl-A - dialdehidna oblika ligstrozid aglikona, lignane, luteolin in apigenin (preglednica 5).

Preglednica 5: Vsebnost posameznih in skupnih fenolnih spojin, ki so podane v mg/kg olja in določene z metodo HPLC v okviru širše raziskave, ki jo je opravila z namenom priprave diplomskega dela Nika Slokar

VZOREC	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)	SKUPNI FENOLI (mg/kg)
OL-01	6,72	7,20	64,29	35,73	23,34	8,98	17,84	2,69	1,08	276
OL-02	35,39	39,73	3,58	6,08	20,96	12,80	8,44	3,37	2,98	250
OL-03	1,67	2,23	75,55	46,50	10,85	9,01	9,31	2,96	1,85	264
OL-04	1,52	5,09	52,01	91,40	21,03	19,71	22,46	1,75	1,25	327
OL-05	4,51	6,42	110,32	77,32	17,14	21,19	5,73	2,96	1,62	397
OL-06	4,38	5,82	102,09	104,87	47,10	22,84	14,59	4,42	2,20	545
OL-07	1,51	2,72	62,15	83,68	50,38	18,29	12,24	3,41	2,34	448
OL-08	31,53	51,74	51,88	48,69	47,63	22,56	9,99	5,91	2,75	488
OL-09	2,08	3,33	54,48	80,79	67,31	25,13	5,41	3,25	3,17	557
OL-10	0,00	15,24	0,65	0,86	8,41	0,49	24,86	1,83	1,55	117

3.1.2 Reagenti in pribor uporabljeni pri *in vitro* metodah

Za *in vitro* analize smo uporabljali naslednje reagente:

- β -karoten (čistost >97 %, Fluka, Švica)
- DPPH[•] reagent (Sigma, Nemčija)
- etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Švica)
- kalijev dihidrogenfosfat(V) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- kalijev heksacianoferrat(II) (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- kloroform (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina (čistost >95 %, Sigma, Nemčija)
- linolna kislina (čistost >95 %, Sigma, Nemčija)
- metanol (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- n-heksan (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat (analitske čistosti, Alkaloid, Makedonija)
- natrijev hidrogenfosfat(V) (analitske čistosti, Zorka, Šabac, Srbija)
- trikloroocetna kislina (čistost 99,5 %, Merck, Nemčija)
- Tween 20 detergent (Sigma, Nemčija)
- železov(III) klorid (čistost >99 %, Carlo Erba Reagenti, Italija)

Za pripravo raztopin smo uporabljali bidestilirano vodo.

Pri *in vitro* metodah smo uporabljali sledeče aparature in pribor:

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)
- magnetno mešalo (IKA[®] RH basic KT/C, Nemčija)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike)
- tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica)

3.1.3 Reagenti in pribor uporabljeni pri *in vivo* metodi

Za *in vivo* analizo smo upodabljali naslednje materiale:

- Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Kvasovko smo hranili na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri 28 °C. Za poskus smo uporabljali 3 dni staro kulturo.

- Gojišče in raztopine

- Trdno YEPD gojišče

Za precepljanje in hranjenje kulture smo uporabili trdno gojišče YEPD.

Preglednica 6: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

Sestavina	masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0
agar (Biolife)	20,0
dH ₂ O	do 1000 mL

Gojišče smo najprej zaklejili, nato pa sterilizirali 20 minut pri temperaturi 120 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in razlili v petrijevke.

- Tekoče YEPD gojišče

Tekoče YEPD gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase (kultivacija na stresalniku do stacionarne faze rasti).

Preglednica 7: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

Sestavina	masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0
dH ₂ O	do 1000 mL

- **50 mM Kalij-fosfatni pufer (pH = 7,0):**

- KH_2PO_4 (Merck) za pripravo 50 mM vodne raztopine (A)
- K_2HPO_4 (Merck) za pripravo 50 mM vodne raztopine (B)
- $V(A) + V(B) \Rightarrow$ 50 mM kalijev fosfatni pufer (pH = 7,0)

- **50 mM Kalij-fosfatni pufer (pH = 7,8):**

- KH_2PO_4 (Merck) za pripravo 50 mM vodne raztopine (A)
- K_2HPO_4 (Merck) za pripravo 50 mM vodne raztopine (B)
- $V(A) + V(B) \Rightarrow$ 50 mM kalijev fosfatni pufer (pH = 7,8)

- 96 % etanol (Merck)
- dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetat (Sigma) za pripravo 1 mM izhodne raztopine v 96 % etanolu

Pri *in vivo* metodi smo uporabljali sledeče aparature in pribor:

- 96-mestne mikrotiterske ploščice za merjenje fluorescence (Nunc)
- petrijeve plošče (Golias)
- 1000-mL erlenmajerice s stransko kivetom (Shott Duran)
- centrifuge (Eppendorf 5415C, Tehnica Železniki Centric 322A)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire II (Tecan)
- hladilnik (LTH)
- magnetno mešalo (Tehnica Železniki 550 M)
- pH meter (Mettler Toledo)
- inkubator Sutjeska
- zmrzovalnik (- 20 °C) LTH Škofja Loka
- 2-mL mikrocentrifugirke Eppendorf
- števna ploščica Bürker-Türk
- mikroskop Leica ATC 2000
- rotacijski stresalnik Mrzel
- brezprašna komora Iskra PIO SMBC 122
- spektrofotometer za merjenje optične gostote (Iskra MA 9520)
- tehnica (Sartorius analytic)

4 METODE

4.1 METODE ZA IN VITRO ANALIZE

4.1.1 Ekstrakcija

K 10 g EDOO smo dolili 50 mL n-heksana in zmes prenesli v 100 mL lij ločnik. Dodali smo ekstrakcijsko topilo – zmes metanol/voda (80:20 v/v). Ekstrakcijo smo izvedli pri sobni temperaturi v treh stopnjah tako, da smo topilo vsakokrat ločili od ekstrakcijske zmesi in ga nadomestili s svežim.

10 g oljčnega olja + 50 mL n-heksana → 3 x ekstrakcija z 20 mL ekstrakcijskega topila (stresanje 4 minute) → združitev ekstraktov

Ekstrakcijo smo izvedli v štirih ponovitvah. Ekstrakte vseh štirih ponovitev smo združili in na rotavaporju odparili ekstrakcijsko topilo. Suhi preostanek pa smo raztopili v 2,5 mL metanola (analitske čistosti).

4.1.2 Določitve vsebnosti skupnih fenolnih spojin: Folin – Ciocalteu metoda

Postopek določitve vsebnosti skupnih fenolnih spojin je povzet po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). V mikrocentrifugirko smo odmerili 0,2 mL raztopine ekstrakta, mu dodali 0,125 mL Folin - Ciocalteu reagenta (razredčen z vodo v razmerju 1:2, v/v) in 0,125 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata in dopolnili z vodo do 1 mL; ter premešali. V Eppendorfovi centrifugi 5415c smo centrifugirali 6 minut pri 13000 obr/min. Po 30 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm, A_{765} , proti slepemu vzorcu, ki je bil pripravljen po istem postopku, le da je bila namesto ekstrakta dodana bidestilirana voda. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah.

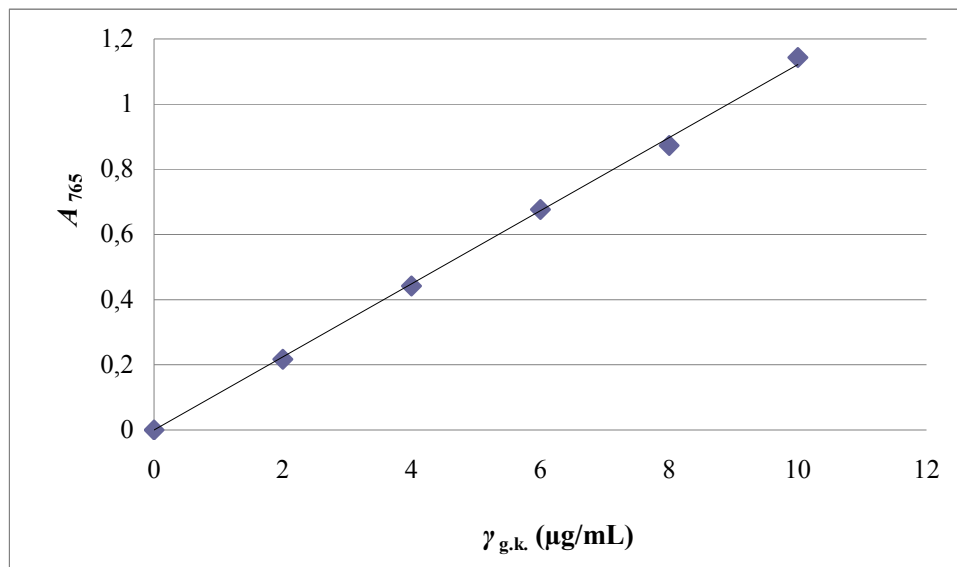
4.1.2.1 Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 25 mL bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline, jo raztopili v destilirani vodi in razredčili raztopino do 25 mL. Koncentracija pripravljene izhodne raztopine je bila 400 $\mu\text{g/mL}$. V mikrocentrifugirke smo dodali različne volumne izhodne raztopine in v skladu s Folin-Cioaltea metodo izmerili absorbanco. V preglednici 8 so podane vrednosti za masno koncentracijo galne kisline $\gamma_{\text{g.k.}}$ ($\mu\text{g/mL}$) in vrednosti izmerjene absorbance.

Preglednica 8: Volumen (V) izhodne raztopine galne kisline, masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{\text{g.k.}}$) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{765})

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

Iz izmerjene absorbance in masne koncentracije galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijsko analizo smo določili koeficient naklona premice (umeritvene krivulje), ki je prikazana na sliki 3. Vrednost koeficienta k je $(0,1121 \pm 0,0002) (\mu\text{g/mL})^{-1}$; ($R=0,9987$).



Slika 3: Umeritvena krivulja z galno kislino

Masno koncentracijo ($\gamma_{g,k}$) skupnih fenolnih spojin smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{g,k} = A_{765} / k \quad \dots(17)$$

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v metanolnem ekstraktu ekstra deviškega oljčnega olja smo izrazili kot miligram galne kisline na gram olja. Izračunali smo jo iz koncentracije skupnih fenolnih spojin razredčitve ekstrakta in mase oljčnega olja.

4.1.3 Analiza sposobnosti redukcije

Sposobnost redukcije smo določili v skladu s postopkom, ki so ga opisali Juntachote in sodelavci (2006). V epruvete smo odpipetirali 0,5 mL dobljenega ekstrakta različnih koncentracij in jim dodali 2,5 mL fosfatnega pufru (pH = 6,8), 2,5 mL kalijevega heksacianoferata (II) (1 % raztopina) in 2,5 mL trikloroacetne kisline (20 % raztopina) ter premešali. Dobljeno mešanico smo dali v mikrocentrifugo 5415c za 15 minut pri 13000 obr/min. Po centrifugiranju smo odvzeli 2,5 mL supernatanta, mu dodali 2,5 mL destilirane vode in 1 mL železovega (III) klorida ter po 25 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm, A_{740} , proti slepemu vzorcu, ki je bil pripravljen po istem postopku, le da je bilo namesto ekstrakta dodano ustrezno topilo. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah.

4.1.4 Analiza DPPH•

Analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Brand-Williams in sodelovci (1995). Metodo smo izvedli na naslednji način: k 2,9 mL etanolne raztopine DPPH• (0,1 mol/L) smo dodali 0,1 mL raztopine metanolnega ekstrakta EDOO s koncentracijo fenolnih spojin 5 $\mu\text{g/mL}$, premešali in po 30 minutah izmerili intenziteto absorbance pri valovni dolžini 517 nm, A_{vz517} , proti slepemu vzorcu. Za slepi vzorec smo uporabili etanol. Pomerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, A_{k517} , ki je vseboval 2,9 mL raztopine DPPH• in 0,1 mL etanola:

4.1.5 Beljenje β -karotena

Postopek določitve antioksidativne učinkovitosti z metodo beljenja β -karotena smo opravili v skladu z metodo, ki so jo objavili Moure in sodelavci (2000). V bučko smo odmerili 1 mL raztopine β -karotena v kloroformu (0,2 mg/mL), 0,02 mL linolne kisline (analitične čistosti) in 0,2 mL detergenta Tween 20. Premešali in na rotavaporju odparili topilo. K preostanku po odparevanju smo počasi dodali 50 mL oksigenirane destilirane vode (pripravili smo jo z 10 minutnim stresanjem v erlenmajerici). Sledi stresanje, da pripravimo emulzijo. Emulzijo smo razporedili po 5 mL v epruvete, v katere smo dodali vzorec ekstraktov z enakimi koncentracijami FS. Zmes smo izpostavili inkubaciji pri 50 °C za dve uri. Absorbanco, A_{vz470} , smo merili vsakih 10 minut pri valovni dolžini 470 nm proti slepemu vzorcu, ki je vseboval emulzijo brez β -karotena. Absorbanco smo izmerili v dveh paralelkah. Pomerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, A_{k470} , ki smo ga pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali ustrezno topilo.

4.2 METODA ZA *in vivo* ANALIZO

4.2.1 Določanje znotrajcelične oksidacije v kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* z uporabo barvila diklorofluorescein (H_2DCF)

Kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

3 dni staro kulturo *S. cerevisiae* smo s trdnega gojišča YEPD precepili v 400 mL tekočega gojišča YEPD v 1000-mL erlenmajericah s stransko kiveto do optične gostote (OD_{650}) 0,3. Sledila je kultivacija kvasovke na stresalniku pri 28 °C in 220 obr/min do začetka stacionarne faze rasti, kjer smo 100 mL brozge centrifugirali 3 minute pri 4000 obr/min, odstranili supernatant ter sediment 1x sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH = 7,0). Celice smo nato resuspendirali v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0) do koncentracije $1 \cdot 10^8$ celic/mL.

Suspenziji celic smo dodali določen volumen ekstrakta oljčnega olja (skupni volumen = 20 mL), (preglednica 9),

Preglednica 9: Volumni ekstrakta oljčnega olja, ki smo jih dodali suspenziji celic

Metanolni ekstrakt EDOO	V dodanega ekstrakta oljčnega olja [μL]	V suspenzije celic [mL]	Koncentracija fenolnih spojin v brozgi [mg/mL]
OL-01	950	19,05	0,095
OL-02	950	19,05	0,095
OL-03	950	19,05	0,095
OL-04	623	19,377	0,095
OL-05	587	19,41	0,095
OL-06	487	19,51	0,095
OL-07	416	19,58	0,095
OL-08	384	19,616	0,095
OL-09	322	19,678	0,095
OL-08 (1)	616	19,38	0,16
OL-09 (1)	516	19,48	0,16

tako da smo dosegli koncentracijo v brozgi 0,095 mg/mL ter 0,160 mg/mL (preglednica 10). Za analizo nismo uporabili vzorca OL-10, ker je bila koncentracije FS prenizka.

Preglednica 10: Preglednica koncentracij v brozgi

		1	2	3	4	5	6
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	A	KONTROLA ₁	OL-02 0,095	OL-04 0,095	OL-06 0,095	OL-08 0,095	OL-08 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	B	KONTROLA ₁	OL-02 0,095	OL-04 0,095	OL-06 0,095	OL-08 0,095	OL-08 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	C	KONTROLA ₂	OL-02 0,095	OL-04 0,095	OL-06 0,095	OL-08 0,095	OL-08 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	D	KONTROLA ₂	OL-02 0,095	OL-04 0,095	OL-06 0,095	OL-08 0,095	OL-08 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	E	Metanol	OL-03 0,095	OL-05 0,095	OL-07 0,095	OL-09 0,095	OL-09 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	F	Metanol	OL-03 0,095	OL-05 0,095	OL-07 0,095	OL-09 0,095	OL-09 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	G	OL-01 0,095	OL-03 0,095	OL-05 0,095	OL-07 0,095	OL-09 0,095	OL-09 (1) 0,160
Ekstrakt EDOO c_{FS} v brozgi (mg/mL)	H	OL-01 0,095	OL-03 0,095	OL-05 0,095	OL-07 0,095	OL-09 0,095	OL-09 (1) 0,160

Po 1-h izpostavitvi celic ekstraktom oljčnega olja pri 28 °C in 220 obr/min smo preverili njihovo antioksidativno delovanje v celici, in sicer z merjenjem znotrajcelične oksidacije.

Določanje znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo ocenili z uporabo barvila diklorofluorescein (H₂DCF). Spojina, ki jo dodamo v obliki diacetata (H₂DCFDA), prehaja v celico s pasivnim transportom, kjer se deacetilira do H₂DCF s pomočjo nespecifičnih esteraz. V tej obliki se barvilo zadržuje v celici in se v prisotnosti oksidantov oksidira do fluorescentne oblike (DCF). Nastanek fluorescentne oblike barvila je indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997).

V 2-mL Eppendorf centrifugirko smo prenesli 2 mL celične suspenzije in centrifugirali 5 minut pri 14000 obr./min. Po odstranitvi supernatanta smo sediment 2x sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH= 7,8). Sedimentu smo nato dodali 990 µL kalijevega fosfatnega pufru (pH= 7,8) ter inkubirali 5 minut pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo dodali 10 µL 1 mM raztopine sveže pripravljene H₂DCFDA. Centrifugirke smo prenesli na stresalnik in inkubirali v temi 15 min pri T = 28 °C. Sledil je prenos vzorcev suspenzije (200 µL) (preglednica 12) v mikrotitersko ploščico in merjenje fluorescence na čitalcu

mikrotiterskih plošč Safire II. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm, emisije pa 520 nm.

Preglednica 11: Rezporeditev vzorcev na mikrotiterski plošči

		1	2	3	4	5	6
Vzorec	A	KONTROLA₁	OL-02	OL-04	OL-06	OL-08	OL-08 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	B	KONTROLA₁	OL-02	OL-04	OL-06	OL-08	OL-08 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	C	KONTROLA₂	OL-02	OL-04	OL-06	OL-08	OL-08 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	D	KONTROLA₂	OL-02	OL-04	OL-06	OL-08	OL-08 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	E	Metanol	OL-03	OL-05	OL-07	OL-09	OL-09 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	F	Metanol	OL-03	OL-05	OL-07	OL-09	OL-09 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	G	OL-01	OL-03	OL-05	OL-07	OL-09	OL-09 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200
Vzorec	H	OL-01	OL-03	OL-05	OL-07	OL-09	OL-09 (1)
$V_{\text{vzorcev suspenzije}} (\mu\text{L})$		200	200	200	200	200	200

4.3 STATISTIČNA ANALIZA

Analize smo delali v dveh oziroma treh ponovitvah, vrednosti so podane kot povprečje \pm standardni odklon.

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

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \quad \dots(18)$$

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):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots(19)$$

SD = standardni odklon

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 FENOLNE SPOJINE V EKSTRAKTIH VZORCEV EKSTRA DEVIŠKIH OLJČNIH OLJ

Ekstrakcijo smo izvedli z zmesjo metanol/voda (80:20 v/v), po ekstrakciji smo na rotavaporju odparili ekstrakcijsko topilo, suhi preostanek raztopili v 2,5 mL metanola analitske čistosti (metanolni ekstrakt) in določili vsebnosti fenolnih spojin.

Skupne fenolne spojine v ekstraktih ekstra deviškega oljčnega olja smo določili z metodo Folin-Ciocalteu (F-C), ki je bila razvita leta 1927, kasneje pa sta jo izpopolnila Singleton in Rossi. Metoda je preprosta, občutljiva in natančna, ocenjujejo pa tudi, da je F-C metoda najboljša za določanje vsebnosti fenolnih spojin v vzorcih živil (Roginsky in Lissi, 2005). Negativna stran metode je to, da veliko število substanc moti analizo. To so večinoma ogljikovi hidrati, žveplov dioksid, organske kisline, nekatere aminokisline, askorbinska kislina in drugi reducenti (Singleton in sod., 1999; Shahidi and Naczk 2004).

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih EDOO, ki smo jo izrazili kot masa fenolnih spojin (v ekvivalentih klorogenske kisline) na kg olja, je podana v preglednici 12.

Preglednica 12: Vsebnost fenolnih spojin določena z Folin-Ciocalteu metodo

Ekstrakt EDOO	m_{OLJA} (g)	A_{765}	A_{765}	$\bar{A}_{765} \pm SD$	$\bar{A}_{765} \pm SD$	Vsebnost FS v olju \pm SD (mg/kg)
		(par. 1)	(par. 2)	(par. 1)	(par. 2)	
OL-01	40,02	1,0034	0,985	$1,004 \pm 0,001$	$0,983 \pm 0,001$	221 ± 2
		1,0034	0,98238			
		1,005	0,98241			
OL-02	30,07	0,58237	0,52167	$0,584 \pm 0,002$	$0,5218 \pm 0,0004$	164 ± 9
		0,58371	0,52235			
		0,58674	0,52129			
OL-03	40,05	0,82179	0,87657	$0,8216 \pm 0,0001$	$0,8771 \pm 0,0003$	189 ± 6
		0,82158	0,87757			
		0,82151	0,87709			
OL-04	40	0,58727	0,55669	$0,5873 \pm 0,0001$	$0,5572 \pm 0,0003$	255 ± 6
		0,58718	0,55745			
		0,58743	0,55746			

Se nadaljuje

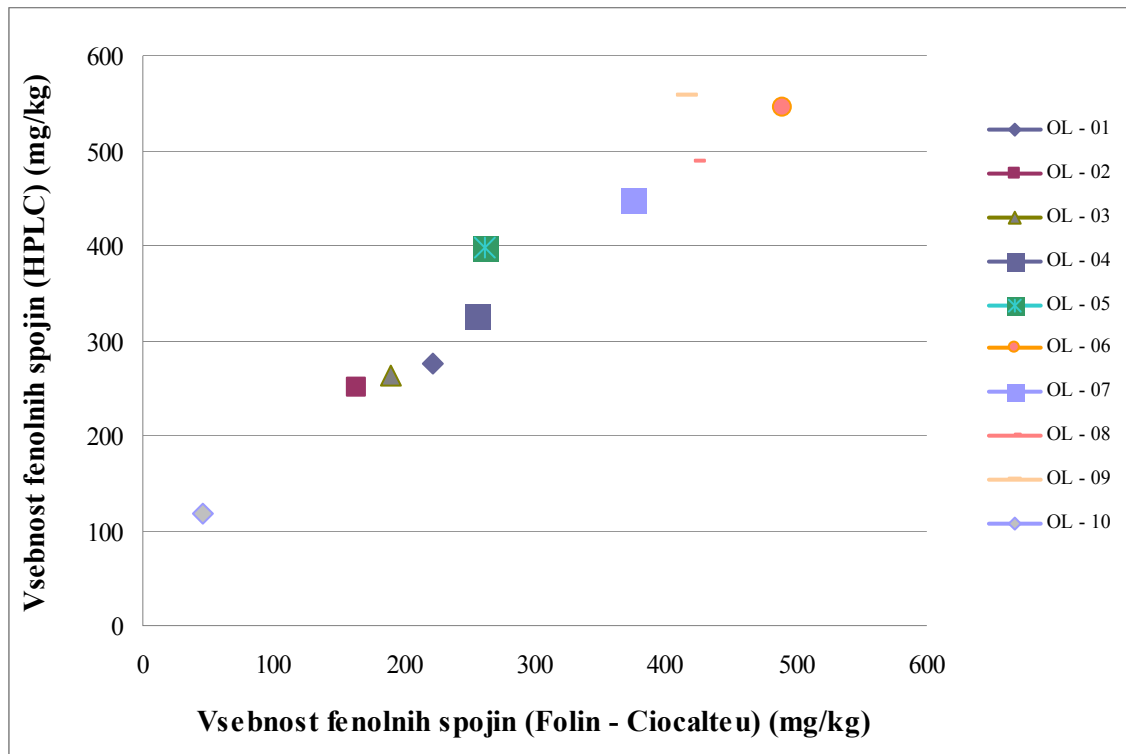
Nadaljevanje preglednice 13: Vsebnost fenolnih spojin določena z Folin-Ciocalteu metodo

OL-05	40,03	0,5541	0,62281	0,554 ± 0,001	0,6229 ± 0,0002	262 ± 15
		0,55453	0,62265			
		0,55269	0,6233			
OL-06	40,02	0,62583	0,83886	0,6261 ± 0,0002	0,839 ± 0,001	490 ± 71
		0,62607	0,83927			
		0,62635	0,84074			
OL-07	40,03	0,91319	0,77056	0,9136 ± 0,0004	0,7699 ± 0,0005	375 ± 32
		0,91349	0,76931			
		0,91418	0,76973			
OL-08	40	1,0009	0,88955	1,0012 ± 0,0004	0,8901 ± 0,0003	421 ± 24
		1,0009	0,89014			
		1,0018	0,89045			
OL-09	40	0,555	0,68952	0,5552 ± 0,0002	0,6899 ± 0,0003	416 ± 45
		0,55517	0,69016			
		0,55547	0,69009			
OL-10	40,03	0,19493	0,21476	0,1949 ± 0,0003	0,2146 ± 0,0003	45 ± 2,2
		0,19533	0,21422			
		0,19436	0,21488			

Najvišjo vsebnost fenolnih spojin v EDOO smo določili v vzorcu OL-06 to je 490 mg/kg. Najmanj pa v vzorcu OL-10, ki je vseboval le 45 mg/kg FS. Nizka vsebnost fenolnih spojin v olju je med drugim lahko posledica nustreznih pogojev skladiščenja, ki inicirajo proces oksidacije v vzorcu. Možne napake skladiščenja so izpostavitve svetlobi, hranjenje v neprimerni embalaži, tajanje in ponovno zamrzovanje vzorcev. Če izvzamemo vzorec OL-10, pridemo do zanimivega pričakovanega rezultata vsebnosti FS v vzorcih, glede na sorto oljke iz katere je bilo pridobljeno olje. Povprečna vrednost skupnih FS v vzorcih pridobljenih iz sorte Leccino je (272 ± 72) mg/kg olja medtem ko olja sorte Istrska belica vsebujejo v povprečju (321 ± 111) mg/kg olja FS. Vzorec OL-08, ki je vseboval olja različnih sort oljk pa je vseboval izjemnih 421 mg/kg olja FS.

V literaturi navajajo avtorji vsebnost skupnih fenolnih spojin od 59 do 153 mg/kg olja (Butinar, 2006). Isti avtor navaja v drugem članku (Butinar, 1999) vsebnosti FS, določenih z F-C metodo, od 207 do 213 mg/kg olja. V literaturi pa lahko zasledimo tudi precej višje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstra deviških oljčnih oljih (Bešter, 2008). V omenjeni raziskavi so vzorci v povprečju vsebovali od 299 do 522 mg/kg olja skupnih fenolnih spojin določenih po metodi F-C. Prav tako, kakor se je pokazalo v naši raziskavi, so vzorci olja pridobljeni iz sorte Leccino pokazali najnižjo vsebnost FS, višja vsebnost je bila določena v vzorcih sorte Istrska belica, najvišja pa v vzorcu mešanice olj iz različnih sort oljk. Vrednosti preteklih analiz so tako primerljive z vrednostmi, ki smo jih določili z našo analizo.

Vsebnosti FS določene z metodo F-C (preglednica 12) so za vse vzorce nižje od vrednosti, ki so jih določili z metodo HPLC (preglednica 5). To je razvidno tudi s slike 4, ki prikazuje odvisnost vsebnosti FS, ki je določena z metodo HPLC od vsebnosti FS, ki smo jo določili z metodo F-C. Odvisnost je linearna, parametri premice, ki smo jih določili z metodo linerne regresije, pa znašajo $a = 1,01$, $b = 78,2\text{mg/kg}$ ($r = 0,977$). Vrednost odseka premice, $b = 78,2$ mg/kg pomeni, da smo v primerjavi s HPLC določitvijo z metodo F-C določili nižjo vsebnosti FS v vzorcih.



Slika 4: Odvisnost vsebnosti FS določenih z metodo HPLC od vsebnosti FS določenih z metodo Folin – Ciocalteu

Bešter je v doktorski disertaciji podala podatke za vsebnost skupnih FS v EDOO Slovenske istre letnika 2003, ki so bile tako kot na naših vzorcih določene z metodama HPLC in F-C. V primerjavi z rezultati omenjene raziskave so bile vrednosti skupnih FS določene na naših vzorcih z metodo HPLC v povprečju za 13 % nižje. Z metodo F-C pa smo v povprečju določili 18 % nižje vrednosti.

Če primerjamo rezultate HPLC analize za preiskovana olja (preglednica 5) z rezultati iz literature (preglednica 2) opazimo, da se rezultati iz literature ne ločijo bistveno od rezultatov analize za preiskovana olja.

Slika 5 prikazuje vsebnost posameznih FS, ki je podana kot masni delež spojine glede na vsebnost skupnih FS določenih z metodo HPLC. Iz slike je razvidno, da določeni vzorci EDOO po sestavi FS odstopajo od ostalih. Predpostavljamo lahko, da razlike v vsebnosti posamezne FS vplivajo tudi na antioksidativni potencial EDOO pri določanju z *in vitro* ter *in vivo* metodami. Iz literature pa je znano, da visoke vsebnosti TyrOH ob hkrati visoki vsebnosti skupnih FS kažejo na olja z bogato sensoriko in z dobrimi antioksidativnimi lastnostmi (Butinar, 1999).

Razvidno je, da sta masna deleža TyrOH in Tyr pri OL-08 ter OL-02 bistveno višja kot pri ostalih vzorcih, hkrati pa imata ta dva vzorca relativno nizke vsebnosti DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA. Poseben primer glede na masni delež Tyr pa je tudi vzorec OL-10 vendar za razliko od prejšnjih ne vsebuje TyrOH. V oljih, ki so bila izpostavljena negativnim pogojem med predelevo in skladiščenjem, je velika verjetnost, da poteče proces razgradnje olevropeina in listrozida do TyrOH ter Tyr. Glede na podatke iz literature lahko pri takih vzorcih sklepamo na slab antioksidativni potencial (Bandelj in sod., 2005).

V literaturi smo zasledili naslednje podatke za antioksidativni potencial FS: TyrOH, O-Agl, L-Agl, Tyr (Carrasco-Pancorbo in sod., 2005) ter TyrOH, olevropein, Tyr (Valavanidis in sod., 2004). Avtor Owen in sod. (2000) so določili vrednost EC_{50} za TyrOH in Tyr. Uporabili so posamezni spojini in ne mešanice FS ter ugotovili, da ti dve spojini veliko bolje učinkujeta antioksidativno kot klasičen predstavnik antioksidanov vitamin E (Trolox). V vseh omenjenih raziskavah je AOP spojin TyrOH in Tyr določen samo z *in vitro* analizami v nadaljevanju pa nas bo zanimalo, če imata ti dve spojini tudi pomembno vlogo pri *in vivo* AOP.

Vzorci se med sabo razlikujejo tudi po vsebnosti spojin DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA. Vzorca OL-10 in OL-02 vsebujeta bistveno nižjo vsebnost kot ostali vzorci. V skladu z razgradnimi procesi olevropeina in luteolina so naši vzorci v primeru visokih vsebnosti spojin DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA vsebovali nizko koncentracijo Tyr in TyrOH.

V literaturi smo zasledili naslednjo lastnost FS v EDOO: olevropein in njegovi razgradni produkti so ortodifenoli in imajo višji AOP kot razgradni produkti listrozida, ki so monofenoli (Bešter, 2008). Iz tega razloga, nas je zanimalo, kakšna je vsebnost skupnih razgradnih produktov listrozida in olevropeina. Vsebnosti so podane v preglednici 13.

Preglednica 13: Vsebnost razgradnih produktov ligstrozida in olevropeina v preiskovanih vzorcih

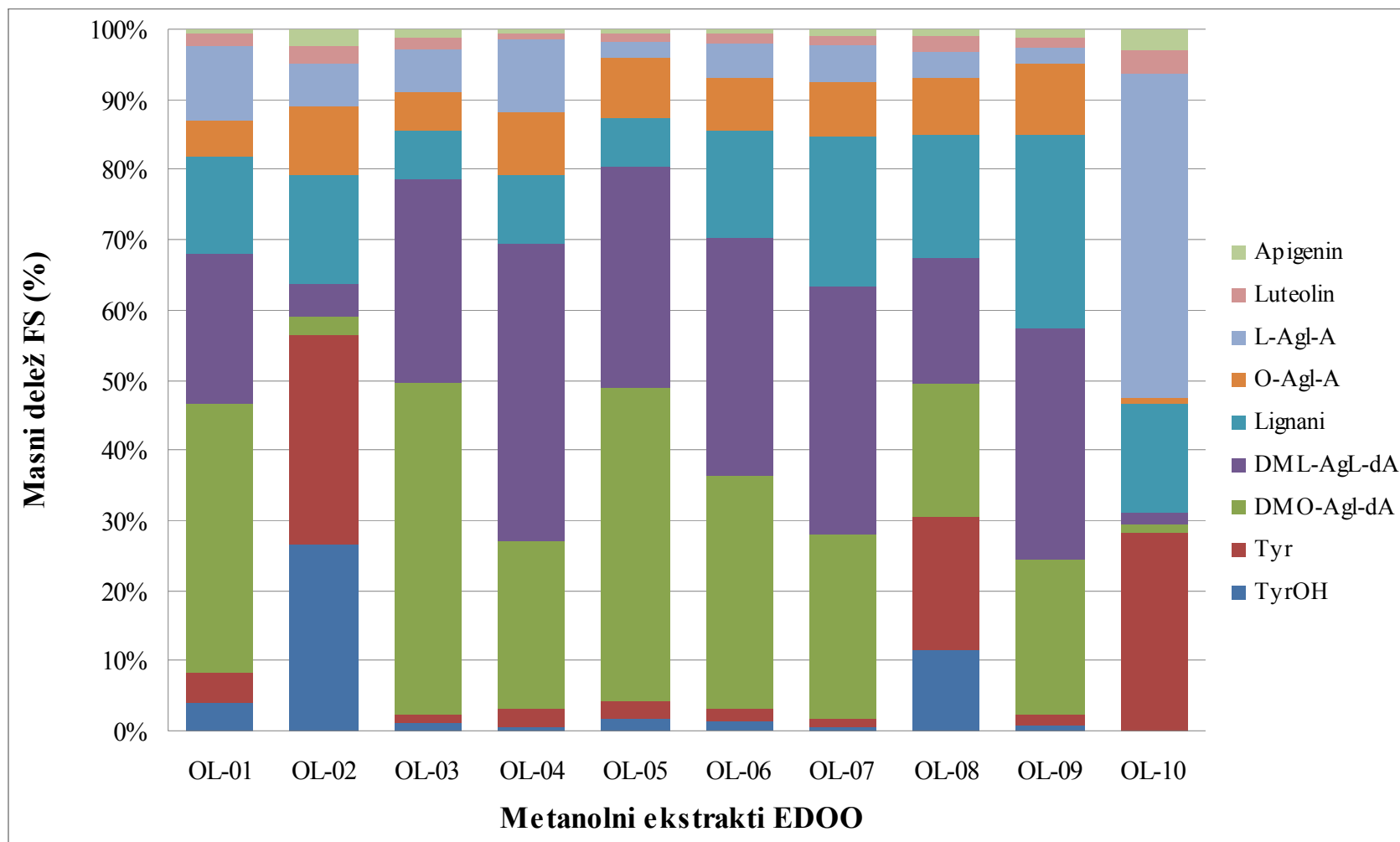
Vzorec	razgradni produkti olevropeina		razgradni produkti ligstrozida	
	<i>m</i> (mg/kg)	masni delež (%)	<i>m</i> (mg/kg)	masni delež (%)
OL-01	79,99	28,95	60,77	22,02
OL-02	51,77	20,75	54,25	21,70
OL-03	86,32	32,63	58,04	21,98
OL-04	73,24	22,43	118,95	36,38
OL-05	136,02	34,23	89,47	22,54
OL-06	129,31	23,72	125,28	22,99
OL-07	81,95	18,26	98,64	22,02
OL-08	105,97	21,75	110,42	22,63
OL-09	81,69	14,69	89,53	16,07
OL-10	1,14	0,97	40,96	35,01

Glede na to, da naj bi razgradni produkti olevropeina imeli višji AOP kot razgradni produkti ligstrozida pričakujemo, da bodo vzorci OL-01, OL-03 in OL-05 pokazali najboljši AOP.

V literaturi smo zasledili vsebnosti lignanov v EDOO od 11,4 mg/kg (Bešter, 2008) pa vse do 275,0 mg/kg (Boscou, 2008). Avtor Hassan in sod. (2004) lignanom pripisujejo tudi dober antioksidativni potencial v *in vivo* pogojih v nadaljevanju nas bo zanimalo, če se je to pokazalo tudi na primeru naših vzorcev.

Ostale spojine O-Agl-A, L-Agl-A, luteolin in apigenin ne kažejo bistvenega odstopanja v vsebnosti med vzorci prav tako vsebnosti bistveno ne odstopajo od vsebnosti podanih v literaturi. Vsebnosti luteolina in apigenina so sicer relativno nizke v primerjavi z ostalimi fenolnimi spojinami. Luteolin kaže lastnosti antioksidanta, preprečuje rast rakavih celic, lipidno peroksidacijo, nastajanje tumorjev (Cai in sod., 1997), medtem ko apigenin deluje prooksidativno in povzroča tvorbo ROS, a ima kljub temu pozitivne učinke, saj povzroča apoptozo rakavih celic (levkemija, kožni rak) (Miyoshi in sod., 2007). Predpostavljamo pa, da zaradi izredno nizkih vsebnosti obeh spojin, ti dve spojini ne bosta igrali pomembne vloge v preprečevanju oksidacije v *in vivo* ter *in vitro* sistemu.

Najnižji masni delež spojine O-Agl-A in hkrati najvišji masni delež spojine L-Agl-A določena v vzorcu OL-10 odstopata od ostalih vzorcev vendar ta podatek samo kaže na to, da je bila vsebnost ligstrozida bistveno višja kot vsebnost olevropeina v tem vzorcu.



Slika 5: Vsebnost posameznih FS, ki je podana kot masni delež spojine (%) glede na vsebnost skupnih FS določenih z metodo HPLC

4.2 SPOSOBNOST REDUKCIJE

Drugo ime metode je FRAP (antioksidativna moč redukcije železa). Metoda temelji na sposobnosti fenolnih spojin da reducirajo Fe^{3+} v Fe^{2+} . Ob prisotnosti reagenta kalijevega heksacianoferata (II) Fe^{2+} ioni tvorijo obarvan kompleks, ki ga zasledujemo z merjenjem absorbcije pri 740 nm (Roginsky in Lissi, 2005).

Redukcijska sposobnost vzorca je pomemben pokazatelj *in vitro* antioksidativne učinkovitosti. V preglednici 14 so podane vrednosti A_{740} , ki smo jih določili pri izbranih koncentracijah FS metanolnih ekstraktov EDOO v reakcijski zmesi. Pri analizi sposobnosti redukcije nas je zanimala odvisnost A_{740} od koncentracije FS v reakcijski zmesi. Omenjena odvisnost je ponazorjena na sliki 6, kjer je razvidno, da v preiskovanem koncentracijskem območju absorbanca linearno narašča s koncentracijo FS. Zaradi boljše preglednosti je na sliki 6 ponazorjena le odvisnost za dva vzorca: OL-08 in OL-10.

Sposobnost redukcije smo kvantitativno ovrednotili iz naklona premic ter izrazili kot koeficient redukcije (C_R). Iz preglednice 14, kjer so za vse preiskovane metanolne ekstrakte EDOO podane vrednosti C_R s pripadajočim koeficientom regresije, in iz slike 6, kjer so zaradi nazornejše predstavitve prikazane vrednosti C_R , je razvidno, da je imel najvišji naklon premice, torej največjo sposobnost redukcije, ekstrakt vzorca OL-05, za katerega znaša vrednost C_R $(0,242 \pm 0,009) (\mu\text{g/mL})^{-1}$. Najnižjo in v okviru eksperimentalne napake enako sposobnost redukcije pa sta pokazala ekstrakta vzorcev OL-03 in OL-06 s C_R vrednostjo $(0,138 \pm 0,003) (\mu\text{g/mL})^{-1}$ in $(0,144 \pm 0,005) (\mu\text{g/mL})^{-1}$.

Pri tej analizi bi težko določili, katere od FS so prispevale k boljši in katere k slabši antioksidativni učinkovitosti *in vitro*.

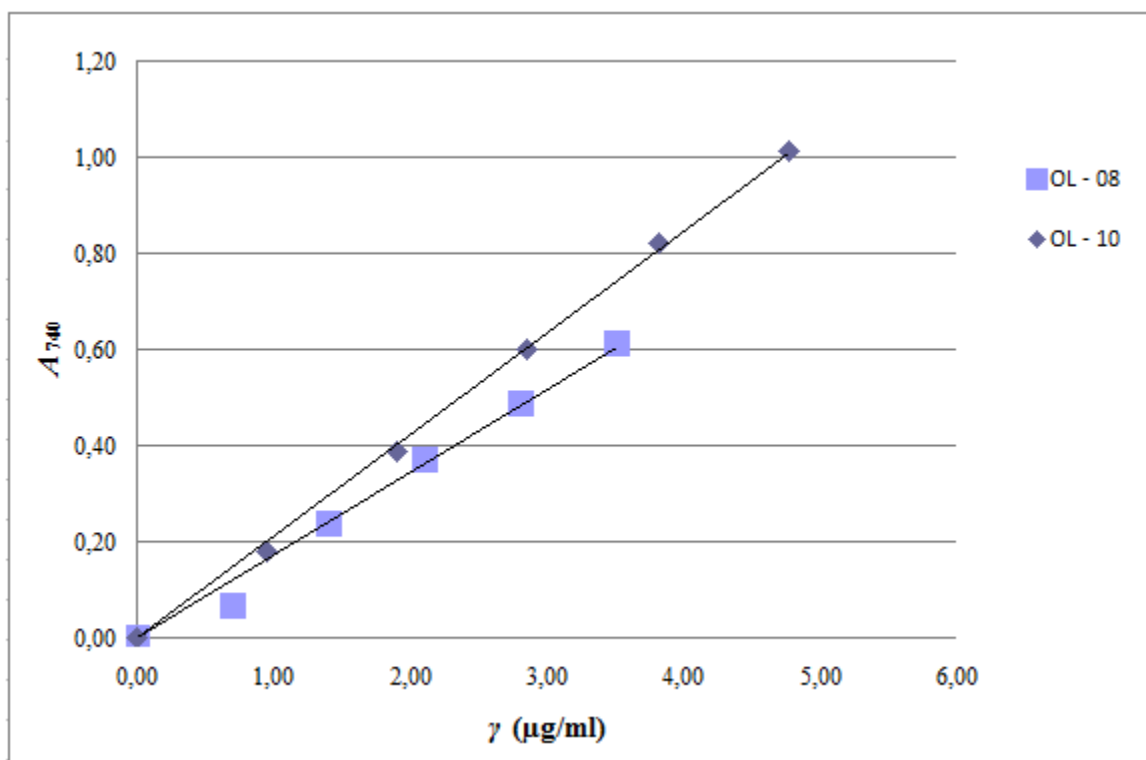
Preglednica 14: Koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{740}) ter koeficient sposobnosti redukcije (C_R) metanolnih ekstraktov EDOO

Metanolni ekstrakti EDOO	γ v reakcijski mešanici ($\mu\text{g/mL}$)	A_{740}				$C_R \pm SD$ (mL/ μg)	R
		$A_{740}(1)$	$A_{740}(2)$	$A_{740}(3)$	$A_{740}(\text{povp}) \pm SD$		
OL - 01	0,92	0,12772	0,12611	0,12708	0,1269 \pm 0,0005	0,186 \pm 0,006	0,994
	1,85	0,29071	0,29062	0,29129	0,2908 \pm 0,0002		
	2,77	0,49227	0,49243	0,49320	0,4926 \pm 0,0003		
	3,69	0,68889	0,69001	0,69050	0,6898 \pm 0,0006		
	4,62	0,90293	0,90407	0,90528	0,9040 \pm 0,007		
OL - 02	1,03	0,17428	0,17578	0,17772	0,175 \pm 0,001	0,175 \pm 0,006	0,995
	2,06	0,29743	0,29957	0,30095	0,299 \pm 0,001		
	3,08	0,49620	0,49757	0,49960	0,497 \pm 0,001		
	4,11	0,74278	0,74367	0,74546	0,7439 \pm 0,0009		
	5,14	0,93320	0,93775	0,93533	0,935 \pm 0,001		
OL - 03	1,58	0,23881	0,23952	0,23966	0,2393 \pm 0,0003	0,138 \pm 0,002	0,998
	3,16	0,43380	0,43440	0,43520	0,4344 \pm 0,0004		
	4,73	0,61639	0,61735	0,61786	0,6172 \pm 0,0005		
	5,52	0,78864	0,78968	0,79002	0,7894 \pm 0,0005		
	6,31	0,87565	0,87805	0,87904	0,877 \pm 0,001		
OL - 04	0,64	0,07214	0,07309	0,07335	0,0728 \pm 0,0004	0,206 \pm 0,007	0,995
	1,06	0,18449	0,18568	0,18641	0,1855 \pm 0,0006		
	1,70	0,36306	0,36354	0,36463	0,3637 \pm 0,0005		
	2,13	0,46597	0,46720	0,46840	0,4671 \pm 0,0008		
	2,55	0,50739	0,50817	0,50983	0,5084 \pm 0,0009		
OL - 05	0,66	0,08527	0,08576	0,08611	0,0857 \pm 0,0002	0,242 \pm 0,008	0,993
	1,09	0,24556	0,24621	0,24686	0,2462 \pm 0,0004		
	1,75	0,43155	0,43042	0,43282	0,4315 \pm 0,0008		
	2,19	0,55326	0,55455	0,55629	0,554 \pm 0,001		
	3,28	0,79435	0,79634	0,79781	0,796 \pm 0,001		
OL - 06	0,82	0,08413	0,08463	0,08523	0,0846 \pm 0,0003	0,144 \pm 0,004	0,996
	1,64	0,21208	0,21314	0,21410	0,2131 \pm 0,0006		
	2,45	0,29132	0,29218	0,29314	0,2922 \pm 0,0006		
	3,27	0,48546	0,48734	0,48902	0,487 \pm 0,001		
	4,09	0,59263	0,59318	0,59456	0,5934 \pm 0,0007		
OL - 07	0,94	0,06899	0,07000	0,07090	0,0699 \pm 0,0006	0,16 \pm 0,01	0,977
	1,56	0,25837	0,25980	0,26087	0,2596 \pm 0,0008		
	2,50	0,46523	0,46675	0,46837	0,466 \pm 0,001		
	3,13	0,40550	0,40686	0,40931	0,407 \pm 0,001		
	4,69	0,75410	0,75553	0,75635	0,7553 \pm 0,0008		

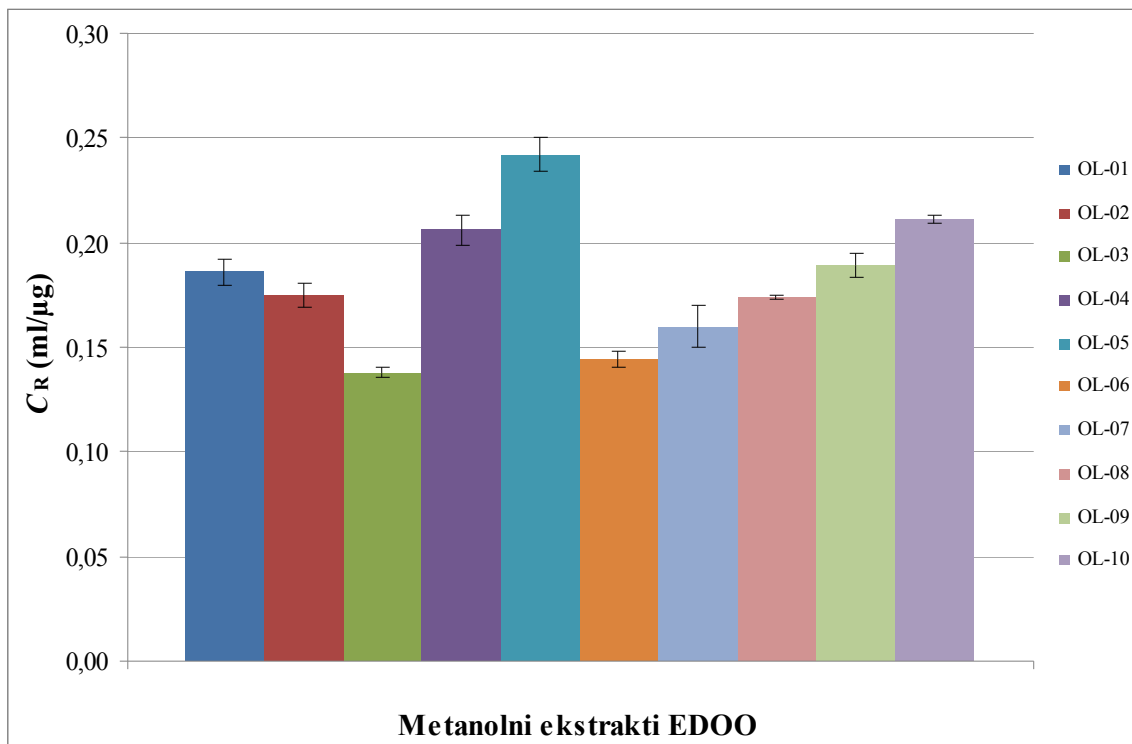
Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 14: Koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (γ), vrednosti izmerjene absorbance (A_{740}) ter koeficient sposobnosti redukcije (C_R) metanolnih ekstraktov EDOO

OL - 08	0,70	0,06748	0,06824	0,06933	0,0683 ± 0,0006	0,174 ± 0,001	0,999
	1,41	0,23693	0,23637	0,23815	0,2371 ± 0,0006		
	2,11	0,36886	0,37068	0,37185	0,370 ± 0,001		
	2,81	0,49035	0,48807	0,48688	0,488 ± 0,001		
	3,51	0,61367	0,61192	0,61050	0,612 ± 0,001		
OL - 09	0,69	0,05933	0,06022	0,06121	0,0602 ± 0,0006	0,189 ± 0,006	0,995
	1,39	0,20364	0,20501	0,20620	0,2049 ± 0,0008		
	2,08	0,40265	0,40431	0,40608	0,404 ± 0,001		
	2,78	0,53516	0,53784	0,53890	0,537 ± 0,001		
	3,47	0,66523	0,66636	0,66793	0,6665 ± 0,0009		
OL - 10	0,95	0,17950	0,18060	0,18147	0,1805 ± 0,0006	0,211 ± 0,002	0,999
	1,91	0,38493	0,38651	0,38807	0,386 ± 0,001		
	2,86	0,59639	0,59852	0,59962	0,598 ± 0,001		
	3,81	0,82096	0,82294	0,82447	0,822 ± 0,001		
	4,77	1,00980	1,01110	1,01370	1,011 ± 0,001		



Slika 6: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi (prikaz za dva vzorca OL-08 in OL-10)



Slika 7: Koeficient sposobnosti redukcije (C_R) za metanolne ekstrakte EDOO

4.3 ANALIZA DPPH[•]

Ta metoda je ena izmed najstarejših in najbolj razširjenih metod za določanje antioksidacijske aktivnosti. Prvič je bila predlagana v petdesetih letih prejšnjega stoletja. Temelji na sposobnosti reakcije stabilnega prostega radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH[•]) z donorjem vodikovega atoma (npr. FS). Pri tej metodi spektrofotometrično spremljamo razbarvanje radikala DPPH[•]. Razbarvanje (in posledično zniževanje absorbance s časom) je posledica reakcije radikala z antioksidantom. Z radikalom DPPH[•] lahko določamo antioksidacijsko aktivnost na dva načina, dinamično in statično. Z dinamično metodo merimo hitrost lovljenja radikala DPPH[•] po dodatku vzorca, ki vsebuje fenolne spojine oz. antioksidante. Pri statični metodi pa se v neki časovno določeni točki, v kateri se vzpostavi ravnotežno stanje in vsebnost prostega radikala s časom ne spreminja več. Merimo vsebnost peostalega prostega radikala DPPH[•]. (Brand-Williams in sod., 2005). Sposobnost antioksidantov za lovljenje radikala DPPH[•] podamo na različne načine. Eden od načinov podajanja rezultatov statične metode je t.i. koncentracija FS, ki je odgovorna za 50 %

zmanjšanje začetne količine DPPH• (EC_{50}). Naslednji način podajanja rezultatov pa je čas, v katerem dosežemo 50 % zmanjšanje začetne količine DPPH• (IC_{50}).

V našem primeru smo se odločili za metodo določitve vsebnosti preostalega prostega radikala DPPH•, kjer smo pri analizi merili absorbanco po določenem času inkubacije, to je po 30 minutah, ko se vsebnost prostega radikala s časom ni spreminjala več in je ostala vrednost za absorbanco nesprmenjena. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum radikala. Boljša kot je antioksidativna učinkovitost preiskovanih metanolnih ekstraktov, manjši delež radikala preostane v reakcijski zmesi in nižja je izmerjena absorbanca.

Delež radikala, ki je po 30 min inkubacije preostal v reakcijski zmesi, smo izračunali v skladu z naslednjo relacijo:

$$\text{DPPH}\bullet = \frac{A_{vz517}}{A_{k517}} \times 100 \% \quad \dots(19)$$

A_{vz517} - absorbanca vzorca
 A_{k517} - absorbanca kontrole

Delež ulovljenega radikala DPPH• pa smo izračunali z relacijo:

$$\text{Delež ulovljenega DPPH}\bullet = 100 \% - \text{delež preostalega DPPH}\bullet \quad \dots(20)$$

V preglednici 15 so podane izmerjene absorbance pri času 30 min ter delež ulovljenega radikala DPPH•. Zradi primerljivosti rezultatov je vsaka reakcijska zmes vsebovala točno 5 µg/mL fenolnih spojin metanolnega ekstrakta EDOO. Višji je delež (%) ulovljenega radikala DPPH• v reakcijski mešanici pomeni boljšo sposobnost FS, ki so prisotne v posameznem vzorcu EDOO, za lovljenje prostih radikalov. S tem pa je boljša tudi antioksidativna sposobnost metanolnega ekstrakta.

Preglednica 15: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{517}) ter delež ulovljenega radikala DPPH[•] v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije

Vzorec	A_{517} po 30 min	% DPPH (%)
OL-01	0,8168	27,69
OL-02	0,8090	29,12
OL-03	0,8020	30,88
OL-04	0,9031	19,19
OL-05	0,7765	30,40
OL-06	0,9162	18,07
OL-07	1,0469	17,13
OL-08	1,0560	16,41
OL-09	0,9751	16,81
OL-10	0,8767	11,17

Da bi nazorneje prikazali razlike v antioksidativni učinkovitosti preiskovanih metanolnih ekstraktov EDOO smo na sliki 8 podali vrednosti za vsebnost ulovljenega radikala DPPH[•] po 30 min inkubacije. Iz preglednice 16 ter slike 8 je razvidno, da ima metanolni ekstrakt vzorca EDOO OL-10 najnižjo sposobnost lovljenja radikala DPPH[•], saj je delež ulovljenega radikala DPPH[•] po 30 min inkubacije v prisotnosti tega ekstrakta znašal 11,2 %, kar je v primerjavi s prestalimi metanolnimi ekstrakti EDOO najnižja vrednost. Najboljšo sposobnost pa ima vzorec OL-03. V prisotnosti metanolnega ekstrakta iz vzorca OL-3 je namreč po 30 min inkubacije delež ulovljenega radikala DPPH[•] 30,9 %. Visoko sposobnost lovljenja prostih radikalov so pokazali tudi ekstrakti vzorcev OL-01, OL-02 in OL-05. Opazimo lahko, da je vzorcem OL-01, OL-03 in OL-05 skupno to, da imajo med preiskovanimi vzorci najvišjo vsoto masnih deležev razgradnih produktov oleuropeina (DMO-Agl-dA, TyrOH, O-Agl-A). Torej so rezultati analiza DPPH[•] skladni z ugotovitvami avtorja v poglavju 4.1. Vzorec OL-02 pa se od omenjenih ekstraktov razlikuje po tem, da ima signifikantno višjo vsebnost TyrOH od vseh preizkovanih ekstraktov.

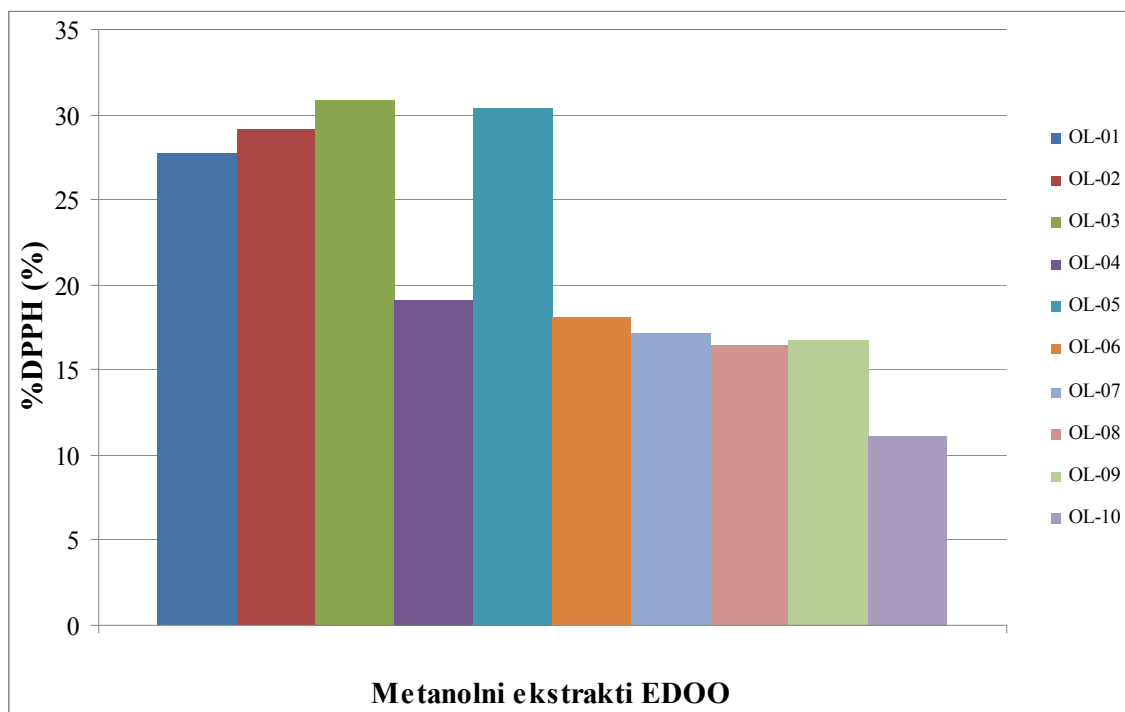
Kot rečeno, je metanolni ekstrakt vzorca EDOO OL-10 pokazal najnižjo sposobnost lovljenja radikala DPPH[•]. V metanolnem ekstraktu omenjenega olja so v primerjavi z ostalimi vzorci določili bistvene odstopanja v vsebnostih posameznih FS. Ekstrakt namreč ni vseboval TyrOHin relativno veliko Tyr, vseboval je zelo nizka deleža DML-Agl-dA in DMO-Agl-dA hkrati pa najvišji masni delež L-Agl-A med vsemi vzorci.

Vzorci OL-01, OL-02, OL-03 ter OL-05 z nizko vsebnostjo lignanov so pokazali najboljši AOP določen z analizo DPPH[•]. In obratno, v vzorcih OL-04, OL-06, OL-07, OL-08, OL-09, OL-10, ki so vsebovali visoke vrednosti lignanov, smo določili nizko vrednost AOP.

V literaturi so lignanom določili visoko antioksidativno učinkovitost, nekaterim lignani, pa sploh niso pokazali antioksidacijske aktivnosti (Hassan in sod., 2004).

Znano je, da je TyrOH zelo dober antioksidant (Owen in sod., 2000) in po vsebnosti le tega sta v našem primeru izstopala ekstrakta OL-02 ter OL-08. Izkazalo pa se je, da oba ekstrakta nista bila enako učinkovita oziroma je ekstrakt vzorca OL-02 pokazal dober AOP, ekstrakt OL-08 pa slabega. Sklapamo lahko, da je do razlike prišlo zato, ker masni delež TyrOH v ekstraktu OL-02 predstavlja 14,20 % v ekstraktu OL-08 pa 6,5 %.

Višje vsebnost spojine DML-AgL-dA v primeru določanja AOP ekstraktov EDOO z analizo DPPH[•] niso prispevale k visoki vrednosti AOP. To se kaže v primeru vzorcev OL-04 (91,40 mg/kg), OL-06 (104,87 mg/kg), OL-07 (83,68 mg/kg), OL-09 (80,79 mg/kg) medtem ko so vzorci z nižjimi vsebnostmi boljše prispevali k lovljenju radikalov DPPH[•].



Slika 8: Delež ulovljenega radikala DPPH v reakcijski zmesi po 30 minutni inkubaciji za metanolne ekstrakte EDOO

4.4 BELJENJE β -KAROTENA

Metoda temelji na reakciji β -karotena s produkti avtooksidacije linolne kisline v vodnih emulzijah. Razbarvanje merimo kot zmanjšanje absorbance v vidnem spektru. Ob dodatku antioksidanta se obseg razbarvanja β -karotena zmanjša. Pomanjkljivost te metode je slaba ponovljivost.

Spektrofotometrično smo merili razgradnjo β -karotena. Zanimal nas je obseg razgradnje β -karotena v kontrolnih vzorcih (brez prisotnega antioksidanta) glede na obseg razpada β -karotena v prisotnosti preiskovanih ekstraktov. Antioksidativno učinkovitost preiskovanih metanolnih ekstraktov v emulziji linolne kisline v vodi smo izrazili kot koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}), ki smo ga izračunali z naslednjo relacijo:

$$C_{AA} = \left[1 - \frac{A_{vz470}^0 - A_{vz470}^t}{A_{k470}^0 - A_{k470}^t} \right] \times 100\% \quad \dots(21)$$

C_{AA} – koeficient antioksidativne učinkovitosti (%)

A_{vz470}^0 – absorbanca vzorca ob času $t = 0$

A_{vz470}^t – absorbanca vzorca ob času $t = x$

A_{k470}^0 – absorbanca kontrole ob času $t = 0$

A_{k470}^t – absorbanca kontrole ob času $t = x$

V preglednici 17 so v odvisnosti od časa inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin v emulziji 0,05 mg/mL in temperaturi 50 °C podane A_{vz470} vrednosti posameznih meritev in ustrezne povprečne vrednosti. V preglednici 16 so za metanolne ekstrakte EDOO podane tudi vrednosti C_{AA} , ki smo jih izračunali z relacijo 21.

Preglednica 16: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{vz470}) za metanolne ekstrakte EDOO pri različnih časih inkubacije (t) ter koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji

Metanolni ekstrakti EDOO	A_{vz470}			t (min)	$C_{AA} \pm SD$ (%)
	A_{vz1}	A_{vz2}	$A_{vzpop} \pm SD$		
OL - 01	0,53237	0,53280	$0,5325 \pm 0,0002$	0	100
	0,40813	0,40051	$0,404 \pm 0,003$	40	$70,0 \pm 1,1$
	0,29776	0,29457	$0,296 \pm 0,001$	80	$49,0 \pm 0,4$
	0,21781	0,21677	$0,2172 \pm 0,0005$	120	$32,0 \pm 0,2$
OL - 02	0,52969	0,53011	$0,5299 \pm 0,0002$	0	100
	0,20129	0,19592	$0,198 \pm 0,002$	40	$12,0 \pm 0,8$
	0,10820	0,10463	$0,106 \pm 0,001$	80	$9,0 \pm 0,4$
	0,09508	0,09305	$0,094 \pm 0,001$	120	$6,0 \pm 0,3$
OL - 03	0,52442	0,52486	$0,5246 \pm 0,0002$	0	100
	0,39986	0,39670	$0,398 \pm 0,001$	40	$66,0 \pm 0,1$
	0,30381	0,30501	$0,3044 \pm 0,0006$	80	$52,0 \pm 0,1$
	0,22668	0,22762	$0,2271 \pm 0,0004$	120	$35,6 \pm 0,05$
OL - 04	0,50932	0,51041	$0,5098 \pm 0,0005$	0	100
	0,28476	0,27994	$0,282 \pm 0,002$	40	$39,0 \pm 0,8$
	0,16111	0,15814	$0,159 \pm 0,001$	80	$24,0 \pm 0,4$
	0,10403	0,10614	$0,105 \pm 0,001$	120	$12,0 \pm 0,1$
OL - 05	0,52035	0,52057	$0,5204 \pm 0,0001$	0	100
	0,43510	0,43081	$0,432 \pm 0,002$	40	$77,0 \pm 0,6$
	0,36330	0,36068	$0,361 \pm 0,001$	80	$66,0 \pm 0,3$
	0,29833	0,29449	$0,296 \pm 0,001$	120	$52,0 \pm 0,4$
OL - 06	1,27330	1,27020	$1,271 \pm 0,001$	0	100
	1,07840	1,07110	$1,074 \pm 0,003$	40	$60,0 \pm 0,7$
	0,98516	0,97527	$0,980 \pm 0,004$	80	$44,0 \pm 0,2$
	0,90263	0,90082	$0,9017 \pm 0,0009$	120	$29,0 \pm 0,5$
OL - 07	0,50268	0,50322	$0,5029 \pm 0,0002$	0	100
	0,22296	0,21772	$0,220 \pm 0,002$	40	$25,0 \pm 0,8$
	0,09894	0,09922	$0,0990 \pm 0,0001$	80	$12,7 \pm 0,03$
	0,06238	0,06137	$0,0618 \pm 0,0005$	120	$5,0 \pm 0,2$
OL - 08	0,50488	0,50655	$0,5057 \pm 0,0008$	0	100
	0,13306	0,12814	$0,130 \pm 0,002$	40	$0,0 \pm 0,9$
	0,05532	0,05489	$0,0551 \pm 0,0002$	80	$3,0 \pm 0,2$
	0,04571	0,04524	$0,0454 \pm 0,0002$	120	$0,0 \pm 0,2$

Se nadaljuje

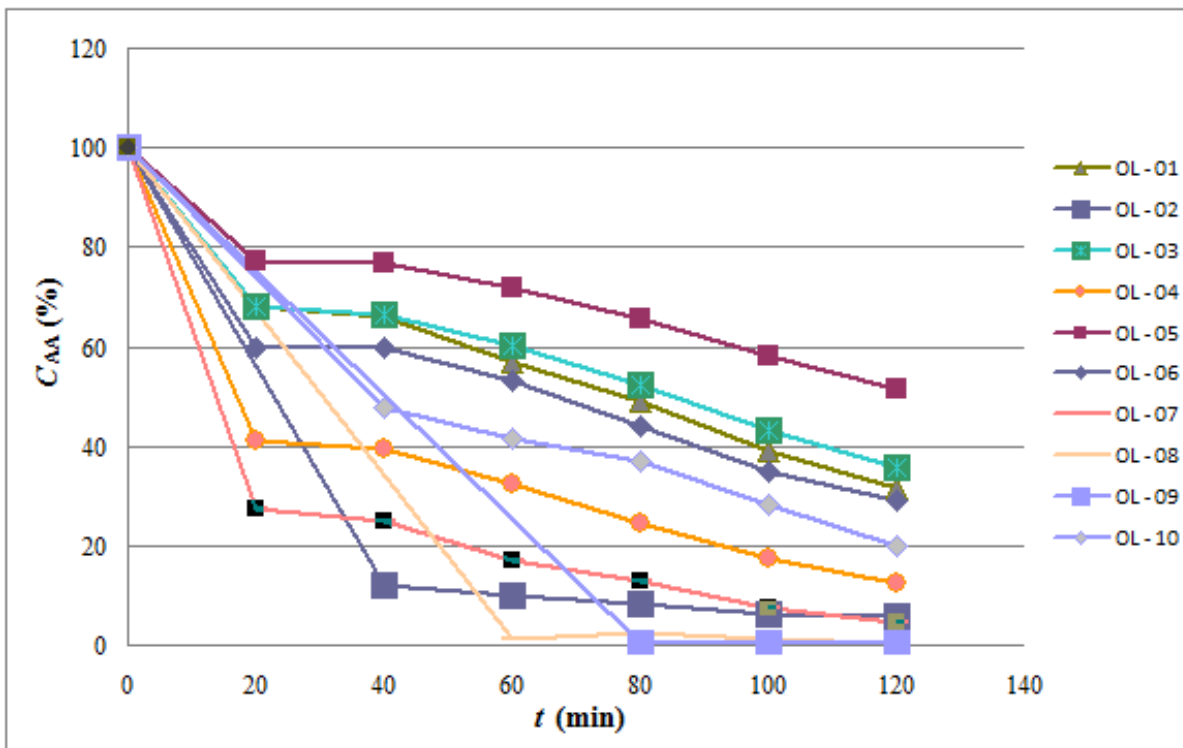
Nadaljevanje preglednice 16: Vrednosti izmerjene absorbance (A_{vz470}) za metanolne ekstrakte EDOO pri različnih časih inkubacije (t) ter koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji

OL - 09	0,49547	0,49647	$0,4959 \pm 0,0005$	0	100
	0,09320	0,09363	$0,0934 \pm 0,0002$	40	$-7,1 \pm 0,08$
	0,03479	0,03651	$0,0356 \pm 0,0008$	80	$0,6 \pm 0,08$
	0,03647	0,03461	$0,0355 \pm 0,0009$	120	$0,0 \pm 0,3$
OL - 10	1,27330	1,27020	$1,271 \pm 0,001$	0	100
	1,07840	1,07110	$1,074 \pm 0,003$	40	$48,0 \pm 0,6$
	0,98516	0,97527	$0,980 \pm 0,004$	80	$37,0 \pm 0,7$
	0,90263	0,90082	$0,9017 \pm 0,0009$	120	$20,0 \pm 0,1$

Na sliki 9 je prikazana odvisnost C_{AA} metanolnih ekstraktov EDOO od časa inkubacije. Iz preglednice 16 in slike 9 je razvidno, da vrednost C_{AA} pada s časom. Najhitreje pade vrednost C_{AA} za metanolne ekstrakte iz vzorcev OL-02, OL-08 ter OL-09. Vidimo, da sta ekstrakta OL-08 ter OL-09 po 60 min oz. po 80 min inkubacije ostala brez antioksidativne učinkovitosti ($C_{AA} = 0\%$). Najpočasneje pada C_{AA} vrednost metanolnemu ekstraktu OL-05, ki je tudi po 120 min inkubacije ohranil vrednost C_{AA} več kot 50 %.

Zaradi nazornejše primerjave antioksidativne učinkovitosti metanolnih ekstraktov v emulziji smo na sliki 10 prikazali C_{AA} vrednosti, ki so jih preiskovani ekstrakti dosegli po 120 minutah inkubacije. Najboljšo antioksidativno učinkovitost po 120 minutah inkubacije je pokazal vzorec OL-05. Poleg že omenjenih ekstraktov iz vzorcev OL-02, OL-08 ter OL-09 je pokazal zelo nizko učinkovitost tudi ekstrakt OL-07.

Ekstrakt EDOO OL-01, OL-03 ter OL-05 so pokazali dobro antioksidativno učinkovitost v sistemu emulzije. Ravno ti trije vzorci so vsebovali najvišje vsebnosti razgradnih produktov olevropeina (preglednica 13).

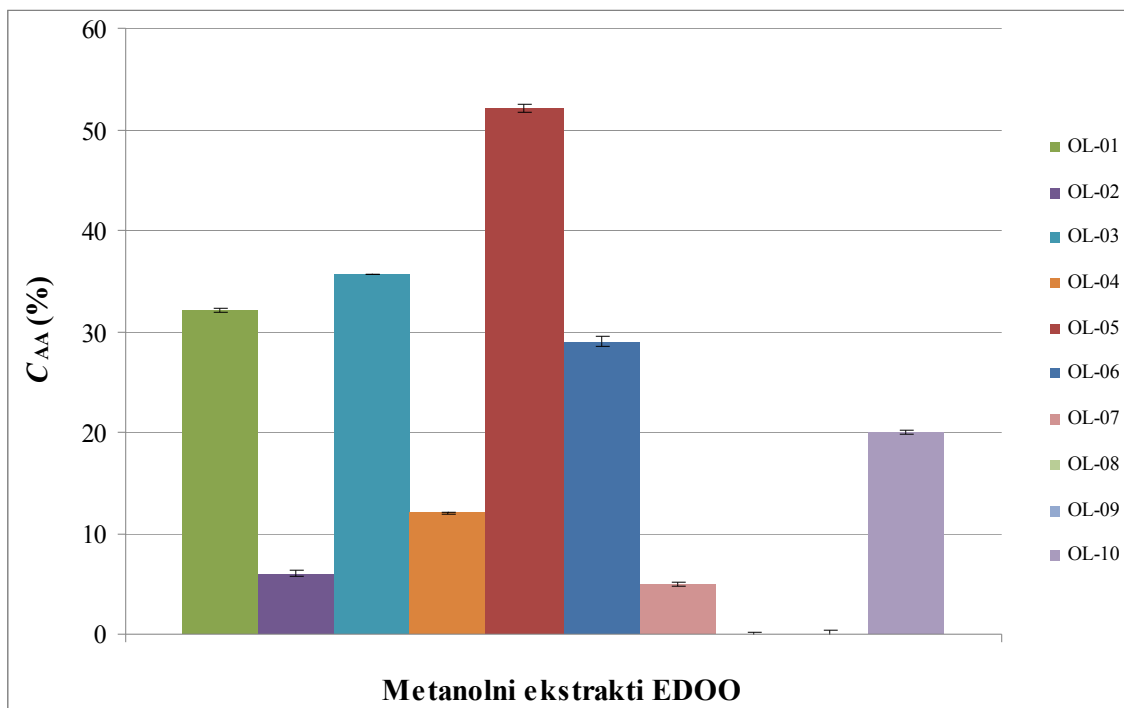


Slika 9: Odvisnost vrednosti C_{AA} od časa za metanolne ekstrakte EDOO

Zanimivo je, da so vsi metanolni ekstrakti vzorcev (OL-07, OL-08, OL-09), ki so se izkazali za slabe lovilce preostalega radikala ($DPPH^{\bullet}$), tudi s to metodo pokazali najslabšo antioksidativno učinkovitost C_{AA} .

Vzorec OL-10 se je izkazal z zadovoljivim AOP, kljub temu, da je njegova sestava FS zelo drugačna od ostalih vzorcev. V primerjavi z ostalimi ne vsebuje TyrOH, ima najnižjo vsebnost DML-Agl-dA, malo luteolina in apigenina visoko vsebnost Tyr ter največ med vsemi L-Agl-A.

V analizi $DPPH^{\bullet}$ se je pokazalo, da so ekstrakti z nizko vsebnostjo lignanov uspešnejši v zaviranju oksidacije od tistih ekstraktov z višjo vsebnostjo. To velja tudi za zaviranje oksidacije linolne kisline v emulziji.



Slika 10: Koeficient antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji po 120 min za metanolne ekstrakte EDOO pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/mL

4.5 DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE (*in vivo*) V KVASOVKAH *Saccharomyces cerevisiae* Z UPORABO BARVILA DIKLOROFLUORESCIN

Za določanje antioksidativne aktivnosti v celici (*in vivo*) se uporabljajo metode s fluorogenimi reagenti, ki v oksidirani obliki drastično fluorescirajo, kar se odraža v povečani intenziteti fluorescence vzorca. Najpogosteje se uporabljata reagenta fluorescein in rodamin.

Za določitev *in vivo* antioksidativne učinkovitosti metanolnih ekstraktov EDOO smo uporabili barvilo diklorofluorescein (H₂DCF) in celice kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Diacetatna oblika spojine diklorofluorescein prehaja v celico, kjer se je deacetilira do H₂DCF s pomočjo nespecifičnih esteraz. Znano je, da se v tej obliki barvilo zadržuje v celici in se v prisotnosti oksidantov oksidira do fluorescentne oblike (DCF). Nastanek fluorescentne oblike barvila je indikator znotrajcelične oksidacije (Rota in sod., 1999). Torej nižja je izmerjena fluorescenca, boljši je *in vivo* določen antioksidativni potencial metanolnega ekstrakta EDOO. Fluorescenco barvila smo izmerili in dobili rezultate, ki so podani v preglednici 18.

Količina posameznega za analizo uporabljenega metanolnega ekstrakta je bila tolikšna, da je bila koncentracija FS, ki smo jih dodali kvasovkam vedno enaka, to je 0,095 mg/mL. Zanimalo nas je tudi, kako različna koncentracija FS vpliva na nivo oksidacije v celici. Iz tega razloga smo metanolna ekstrakta EDOO, OL-08 in OL-09, ki sta vsebovala največ FS dodali tudi v višji koncentraciji 0,16 mg/mL(OL-08 (1) in OL-09(1)).

Za analizo nismo uporabili vzorca OL-10 zaradi prenizke vsebnosti FS določene z metodo F-C.

Ekstrakte FS smo imeli pripravljene v metanolu in zato smo pri analizi izmerili tudi fluorescenco vzorca, v katerem smo celicam kvasovke dodali enak volumen metanola kot je bil dodan v primeru metanolnih ekstraktov. Zanimalo nas je ali prisotnost metanola vpliva na znotrajcelično oksidacijo. Izkazalo se je, da metanol ne vpliva na rezultate analize, saj izmerjena fluorescenčna intenziteta vzorca, kateremu smo dodali le metanol (analitske čistosti) v količini, ki je enaka maksimalni količini metanola v primeru tretiranja vzorca z metanolnim ekstraktom, ni bistveno odstopala od izmerjene fluorescenčne intenzitete kontrole.

Preglednica 17: Rezultati meritev fluorescenčne intenzitete

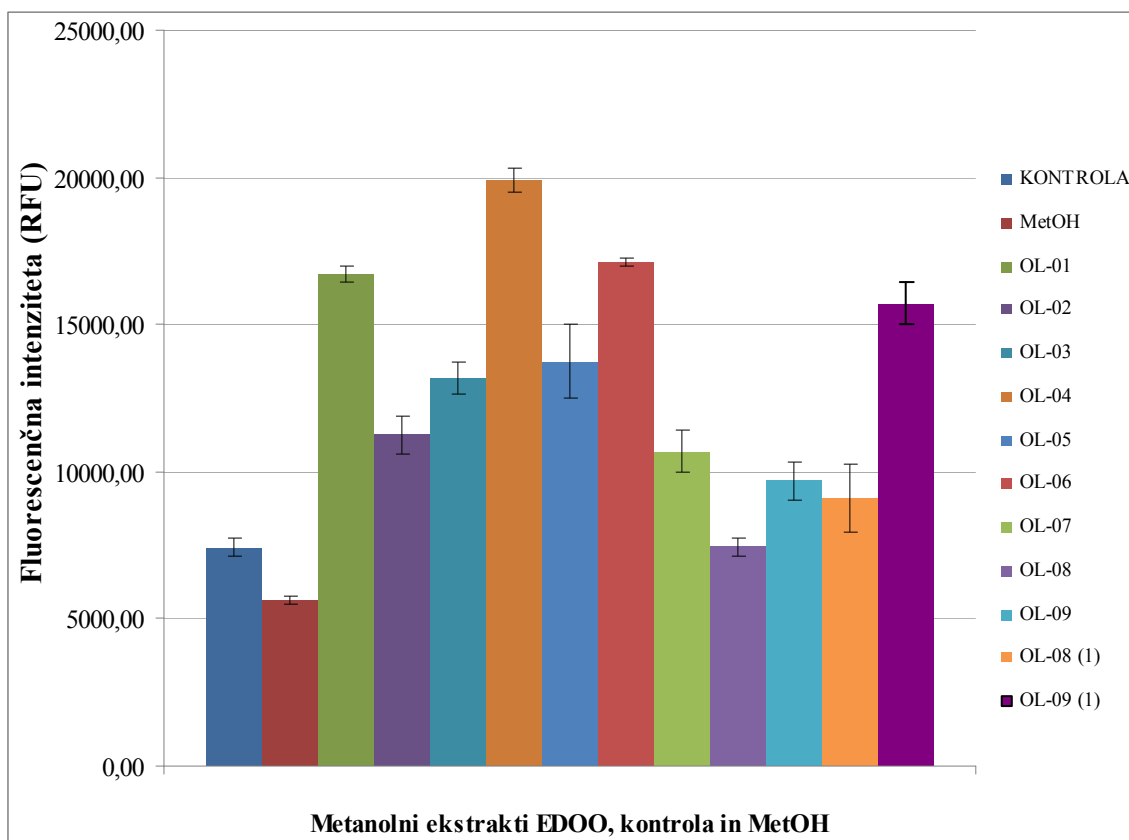
	Povprečje meritev fluorescenčne intenzitete (RFU)	(±) SD
KONTROLA	7420	299
Metanol	5648	157
OL-01	16711	227
OL-02	11252	664
OL-03	13166	548
OL-04	19914	404
OL-05	13747	1263
OL-06	17109	142
OL-07	10689	695
OL-08	7441	320
OL-09	9684	653
OL-08 (1)	9127	1155
OL-09 (1)	15720	739

Na sliki 11 so izmerjene vrednosti prikazane v obliki stolpcev. Če vrednosti fluorescenčnih intenzitet primerjamo glede na kontrolo lahko ugotovimo, da vsi ekstrakti, razen OL-08, delujejo prooksidativno na celice, vendar so med njimi razlike. Visoko vrednost fluorescence torej največje prooksidativno delovanje, ki pomeni najslabši antioksidativni potencial v *in vivo* pogojih je pokazal metanolni ekstrakt vzorca OL-04 (19914 RFU). Nizko vrednost fluorescenčne intenzitete torej najnižje prooksidativno delovanje, ki pomeni med preiskoivanimi ekstrakti najboljši antioksidativni potencial pa kot že rečeno kaže ekstrakt vzorca OL-08 (7441 RFU).

Vzorca (OL-02 in OL-08) z visoko vsebnostjo TyrOH in Tyr, ki bistveno odstopa od ostalih vzorcev, sta *in vivo* pokazala različen antioksidativni potencial, boljši je bil izmerjen v primeru OL-08. Masni delež teh dveh spojin v ekstraktu OL-02 predstavlja skoraj 30 % (Tyr 15,89 %, TyrOH 14,20 %), v OL-08 pa 17% (Tyr 10,60 %, TyrOH 6,5 %).

Zanimivo je, da so v *in vivo* pogojih najboljši AOP pokazali ekstrakti vzorcev OL-08, OL-09, OL-07, OL-02, ki pa niso bili dobri antioksidanti v primeru *in vitro* analiz. Glede na sestavo FS v ekstraktih pri teh vzorcih, razen pri vzorcu OL-02, opazimo visoko vsebnost lignanov, luteolina in apigenina. Ravno ta kombinacija FS, bi lahko bila zelo učinkovita v primeru zaviranja oksidacije v celici. Predvidevamo pa, da so lignani tisti, ki največ prispevajo k zaščiti celice pred ROS. Tudi v literaturi so dokazali, da so lignani zelo pomembni pri preprečevanju rakavih bolezni na koži, prsni, črevesu in pljučih ter preprečevanju oksidacije v celicah (Owen in sod., 2000).

Opazili smo, da so višje koncentracije FS v suspenziji celic (1,6 mg/mL OL-08(1), OL-09(1)) pokazale slabši antioksidativni potencial, kot v primeru, ko smo enaka ekstrakta dodali v nižji koncentraciji FS. Sklepamo lahko, da previsoka koncentracija antioksidantov v *in vivo* pogojih deluje prooksidativno. Prooksidativno delovanje antioksidantov je omenil tudi Laughton (1989), predlagal je, da do prooksidativnega delovanja antioksidantov privedejo specifične koncentracije.



Slika 11: Prikaz izmerjenih fluorescenčnih intenzitet za metanolne ekstrakte EDOO

4.6 PRIMERJAVA REZULTATOV *in vitro* TER *in vivo* ANALIZ

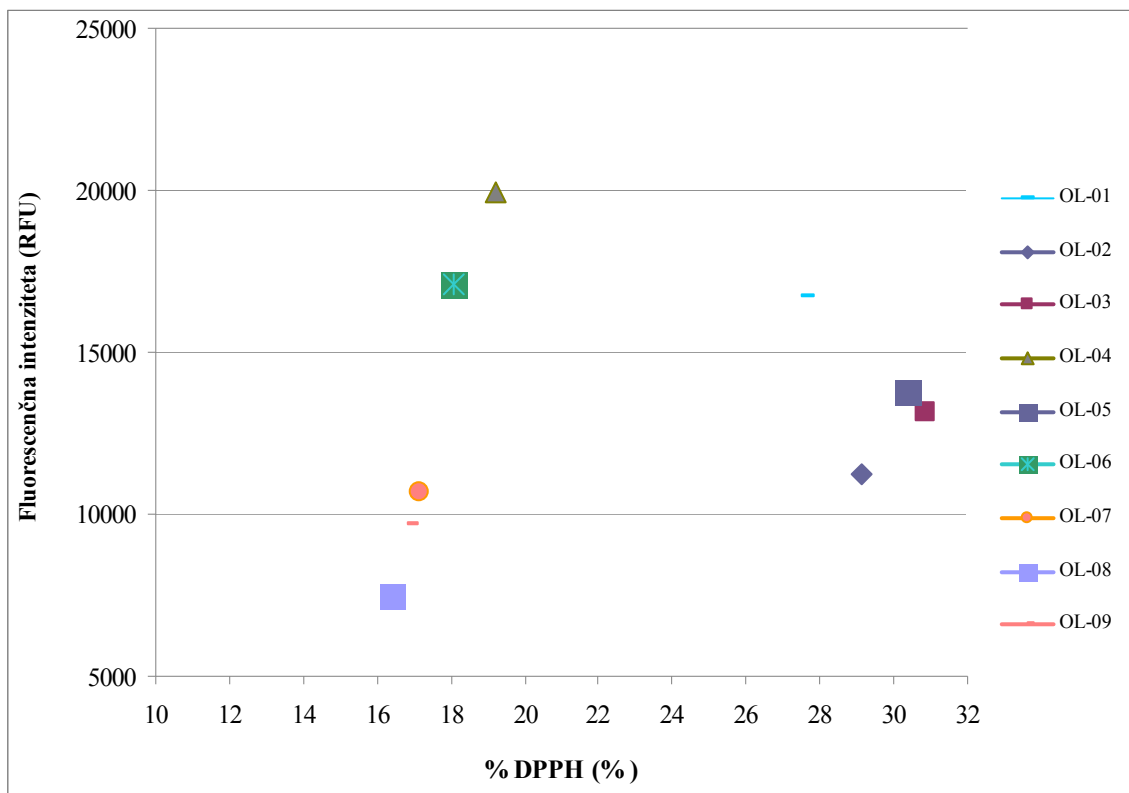
Na slikah 12, 13 in 14 smo primerjali *in vitro* z *in vivo* rezultati določanja antioksidativnega potenciala metanolnih ekstraktov EDOO.

Slika 12 prikazuje odvisnost intenzitete izmerjene fluoresence, ki pokaže učinkovitost ekstrakta v *in vivo* pogojih od deleža ulovljenega radikala DPPH. V splošnem lahko rečemo, da z izjemo ekstraktov vzorcev OL-07, OL-08 in OL-09, antioksidativni potencial v *in vivo* pogojih narašča (znižanje prooksidativnega učinka) s sposobnostjo lovljenja prostih radikalov.

Metanolni ekstrakti vzorcev OL-01, OL-02, OL-03 ter OL-05 so pokazali zelo dobro sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH. Med temi je najučinkovitejši v *in vivo* sistemu ekstrakt vzorca OL-02, ki vsebuje nizko vsebnost DML-Agl-dA in DMO-Agl-dA. Predvidevamo, da na učinkovitost ekstrakta vpliva visoka vsebnost Tyr in TyrOH. Ekstrakta vzorca OL-03 in OL-05, ki sta zelo učinkovita v *in vitro* pogojih polarnega sistema, kakršen je v primeru DPPH analize, v *in vivo* pogojih, kjer morajo FS preiti nepolarni lipidni dvosloj celične membrane pokažeta nižji antioksidativni potencial (višji prooksidativni učinek). Oba ekstrakta vsebujeta relativno visoka masna deleža spojin DML-Agl-dA ter DMO-Agl-dA.

Ekstrakta vzorcev OL-04 in OL-06 sta v obeh primerih pokazala slabo antioksidativno učinkovitost.

Slabšo učinkovitost v primerjavi z ostalimi v *in vitro* okolju so pokazali vzorci OL-07, OL-08 in OL-09 v *in vivo* okolju pa so izmed vseh ostalih pokazali najboljši antioksidativni potencial (najnižji prooksidativni učinek). Med temi je bil najučinkovitejši ekstrakt vzorca OL-08. Glede na sestavo FS je tudi v tem primeru veliko prispevala visoka vsebnost Tyr in TyrOH. Vsi trije vzorci pa so glede na druge vsebovali tudi visoko vsebnost lignanov, ki bi prav tako lahko pozitivno vplivali na zaviranje oksidacije v celicah.

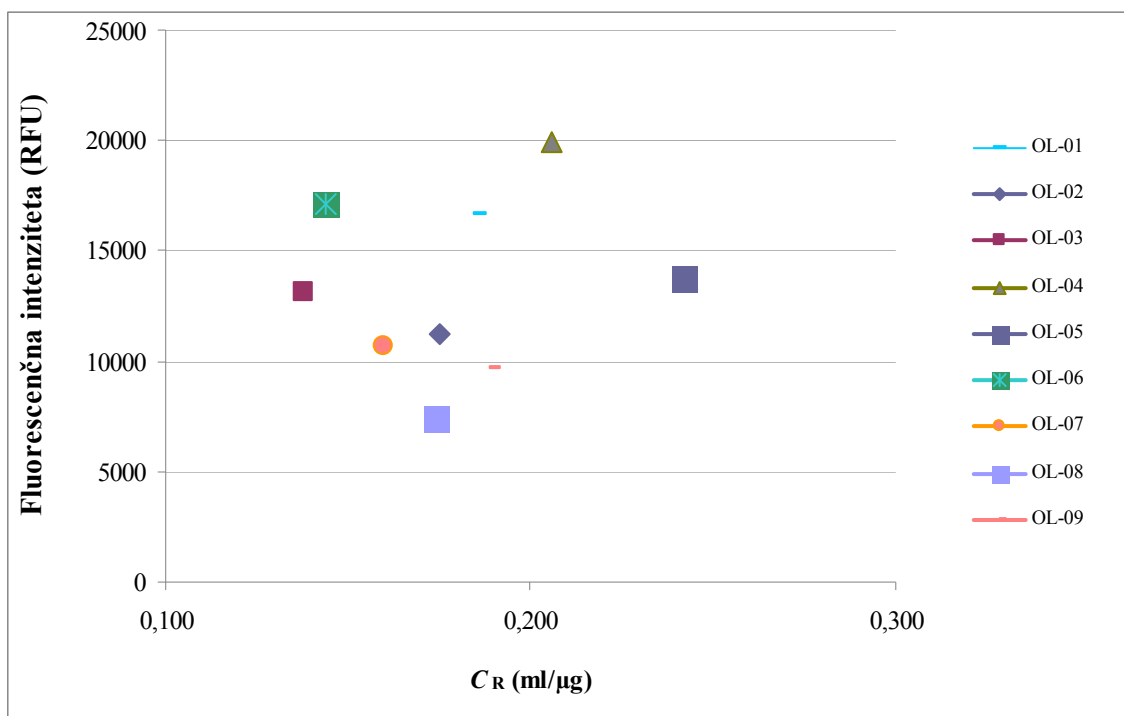


Slika 12: Odvisnost izmerjene intenzitete fluorescence (RFU) od deleža ulovljenega radikala DPPH (% DPPH) za metanolne ekstrakte EDOO

Slika 13 prikazuje odvisnost izmerjene fluorescenčne intenzitete od koeficienta redukcije, ki smo ga določili z analizo redukcijske sposobnosti. V splošnem lahko rečemo, da z izjemo ekstraktih vzorcev OL-04 in OL-05, za ostale preiskovane ekstrakte antioksidativni potencial v *in vivo* pogojih narašča (prooksidativni učinek pada) s sposobnostjo redukcije.

Najslabšo sposobnost redukcije in prav tako slab *in vivo* antioksidativni potencial sta pokazala ekstrakta vzorcev OL-03 in OL-06. Negativno povezavo med *in vivo* ter *in vitro* rezultati smo določili pri ekstraktih vzorcev OL-04 in OL-05. Pokazala sta zelo dobro sposobnost redukcije, vendar slab *in vivo* antioksidativni potencial (močno prooksidativno delovanje). Za oba vzorca je značilna nizka vsebnost lignanov ter visoka vsebnost DMO-Agl-dA v primeru vzorca OL-05 oziroma visoka vsebnost spojine DML-Agl-dA v vzorcu OL-04, kar bi lahko pripomoglo k njuni zelo dobri redukcijski sposobnosti v *in vitro* pogojih.

Metanolni ekstrakti OL-02, OL-07 ter OL-09 so kljub dobremu *in vivo* antioksidativnemu potencialu (nizka prooksidativna učinkovitost) pokazali slabo redukcijsko sposobnost. V ekstraktih vzorcev OL-07 in OL-09 so določili visoko vsebnost lignanov in hkrati visoko vsebnost DML-Agl-dA. Predvidevamo lahko, da je k dobremu *in vivo* potencialu pri vzorcu OL-02 pripomogla visoka vsebnost Tyr in TyrOH, saj vzorec ni vseboval veliko lignanov, ki so pokazali dober AOP v *in vivo* pogojih pri drugih vzorcih.



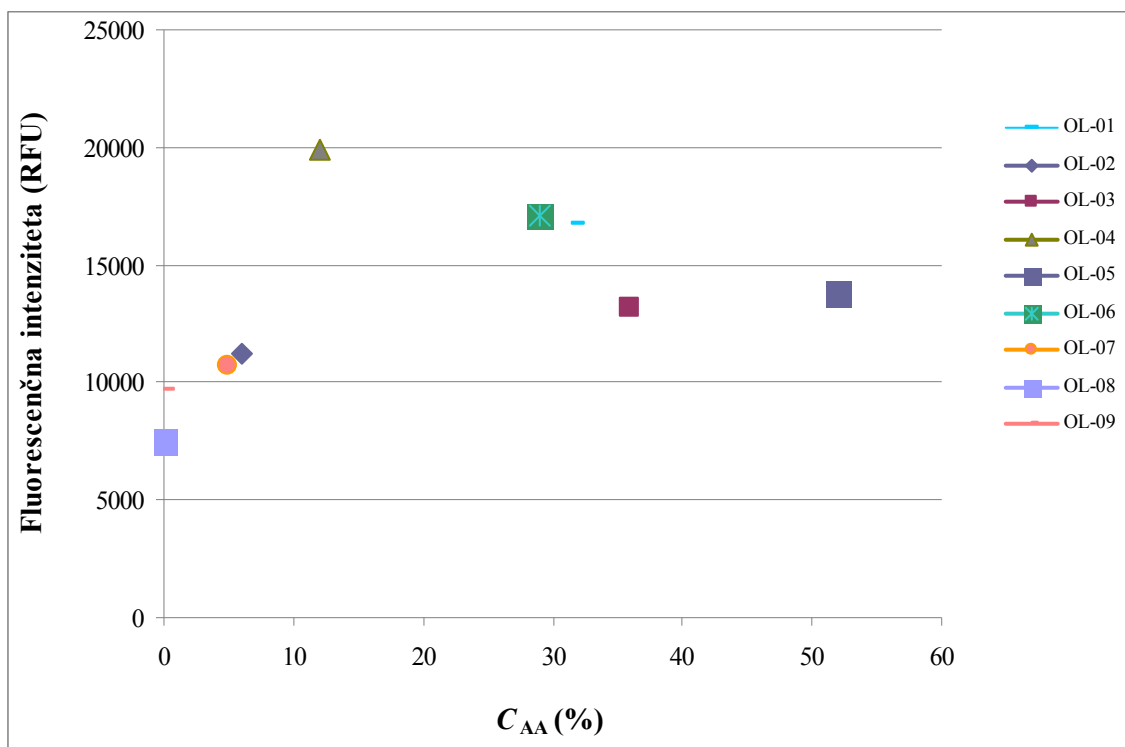
Slika 13: Odvisnost fluorescence od koeficienta sposobnosti redukcije (C_R) za metanolne ekstrakte EDOO

Slika 14 prikazuje odvisnost fluorescence od koeficienta antioksidativne aktivnosti v emulziji. Višja vrednost C_{AA} pomeni boljši antioksidativni učinek določen *in vitro*, višja vrednost fluorescence pomeni močnejše prooksidativno delovanje *in vivo* torej slabši antioksidativni potencial.

Klančnik in sod. (2009) navajajo, da so ekstrakti, v katerih prevladujejo nepolarne FS v sistemu emulzije, kakršno pripravimo pri analizi beljenja β -karotena, bolj antioksidativno učinkoviti od ekstraktov, v katerih prevladujejo polarne FS. Glede na to ugotovitev, bi lahko sklepali, da bodo vzorci, ki so učinkoviti pri analizi beljenja β -karotena, pokazali boljši antioksidativni potencial tudi v primeru *in vivo* analize. Tako kot v *in vitro* pogojih emulzije, kjer se fenolne spojine ustrezno porazdelijo v nepolarni medij maščobne kapljice emulgirane v vodi in delujejo antioksidativno, morajo v *in vivo* pogojih FS preiti nepolarni lipidni dvosloj da lahko antioksidativno učinkujejo v celici.

V našem primeru smo le deloma našli pozitivno povezave med rezultati obeh analiz. Za ekstrakte vzorcev OL-01, OL-03, OL-04, OL-05 ter OL-06 vidimo na sliki 14, da z višanjem učinkoviti v *in vitro* pogojih naraste tudi *in vivo* antioksidativni potencial (fluorescenčna intenziteta pada, kar pomeni slabše prooksidativno delovanje). Med vzorci, ki so pokazali najnižji antioksidativni potencial *in vivo* so se izkazali tisti vzorci, ki vsebujejo manj lignanov v primerjavi z ostalimi. V *in vitro* pogojih pa so učinkoviti vzorci z visoko vsebnostjo DMO-Agl-dA in DML-Agl-dA.

Po drugi strani so med preiskovanimi ekstrakti pokazali boljši antioksidativni potencial (slabše prooksidativno delovanje) v *in vivo* analizi ekstrakti vzorcev OL-08, OL-09, OL-07, OL-02 v primeru beljenja β -karotena pa so ravno ti ekstrakti pokazali v primerjavi z ostalimi slabšo učinkovitost. Po pregledu vsebnosti posameznih FS v ekstraktih ponovno ugotovimo, da ravno ti vzorci vsebujejo visoko vsebnost lignanov.



Slika 14: Odvisnost fluorescence od koeficienta antioksidativne aktivnosti (C_{AA}) v emulziji za metanolne ekstrakte EDOO

5 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo v metanolnih ekstraktih EDOO določili vsebnost fenolnih spojin in z različnimi *in vitro* metodami ter z *in vivo* metodo ugotovili njihovo antioksidativno učinkovitost. Nato smo primerjali rezultate *in vitro* metod z rezultati *in vivo* metode. Prav tako nas je zanimal vpliv sestave fenolnih spojin ekstrahiranih in izbranih vzorcev na antioksidativno učinkovitost posameznega vzorca *in vivo* ter *in vitro*.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Ekstra deviško oljčno olje vsebuje FS; vsebnost skupnih FS je odvisna od sorte oljke iz katere je bilo pridobljeno olje in je primerljiva z rezultati iz literature; vsebnost skupnih FS, ki smo jih določili z metodo F-C, je višja od vsebnosti določenih z metodo HPLC
- Z različnimi metodami *in vitro* smo vsem vzorcem dokazali antioksidativno učinkovitost; metanolni ekstrakti so pokazali sposobnost lovljenja radikalov, sposobnost redukcije kovinskih ionov, zaviranje oksidacije linolne kisline v vodni emulziji ter sposobnost zaviranja oksidacije v celici kvasovke.
- Ekstrakti EDOO, ki so pokazali dobro redukcijsko sposobnost, so se izkazali za dobre lovilce prostih radikalov in so imeli tudi najvišjo antioksidativno učinkovitost določeno z metodo beljenja β -karotena.
- V *in vivo* analizah je med preiskovanimi vzorci najboljši antioksidativni potencial (najnižje prooksidativno delovanje) pokazal ekstrakt vzorca OL-08.
- Med rezultati posameznih analiz antioksidativne učinkovitosti *in vitro* in določitve antioksidativnega potenciala *in vivo* smo le deloma našli pozitivno povezavo.
- Ekstrakti vzorcev s signifikantno višjo vsebnostjo DML-Agl-dA od vsebnosti DMO-Agl-dA so bolj sposobni loviti proste radikale; vzorci z nizko vsebnostjo lignanov so pokazali najboljši antioksidativni učinek pri metodi DPPH[•]; na dobro sposobnost lovljenja prostih radikalov pa vpliva tudi visoka vsebnost TyrOH.
- Visok masni delež razgradnih produktov oleuropeina pozitivno vpliva na zaviranje oksidacije linolne kisline v emulziji.
- Visok masni delež spojin Tyr, TyrOH ter lignanov se kaže v višjem antioksidativnem potencialu v *in vivo* pogojih.

- Antioksidativni potencial v *in vivo* pogojih v večini primerov narašča s sposobnostjo lovljenja prostih radikalov enaka vzajemnost velja tudi za sposobnost redukcije.
- Delno je povezano naraščanje antioksidativne učinkovitosti v emulziji *in vitro* sistema z naraščanjem antioksidativnega potenciala (padanje prooksidativno delovanja) v *in vivo* pogojih.

Rezultati raziskovalnega dela so v večini potrdili naše delovne hipoteze.

6 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo iz izbranih vzorcev ekstra deviških oljčni olj Slovenske Istre s pomočjo solventne ekstrakcije z zmesjo metanol/voda (80:20 v/v) pridobili ekstrakte fenolnih spojin. Vzorci oljčnega olja so bili iztisnjeni iz plodov oljk sort Belica, Leccino, en vzorec pa je bil mešanica sorte Belica, Karbonaca in piranska Mata.

V ekstraktih smo določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Nato smo z različnimi metodami preiskovanim ekstraktom določili antioksidativno učinkovitost v *in vitro* ter v *in vivo* pogojih.

Koncentracijo skupnih FS v ekstraktih smo določili s spektrofotometrično metodo F-C. Vsebnost skupnih FS v ekstraktih EDOO je odvisna od sorte oljke iz katere je bilo pridobljeno olje. Vzorci olja pridobljeni iz sorte Leccino so pokazali najnižjo vsebnost FS ((272 ± 72) mg/kg olja), višja vsebnost je bila določena v vzorcih sorte Istrska belica ((321 ± 111) mg/kg olja), najvišja pa v vzorcu iz mešanice olj iz različnih sort oljk ($421,74$ mg/kg olja). Izkazalo se je, da smo za vse vzorce z metodo F-C določili nižjo vsebnost skupnih FS od vrednosti, kot jih določi metoda HPLC, ki je bila opravljena na enakih vzorcih v predhodni raziskavi z namenom določitve sestave FS v metanolnem ekstraktu in vsebnosti skupnih FS.

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo preverili s tremi *in vitro* metodami (sposobnost redukcije kovinskih ionov, sposobnost lovljenja radikalov in antioksidativna učinkovitost v vodni emulziji linolne kisline). Ugotovili smo, da se v prisotnosti ekstraktov zniža vsebnost prostega radikala, poteče redukcija kovinskih ionov in upočasni oksidacija linolne kisline emulgirane v vodi. Na osnovi tega lahko sklepamo, da imajo vsi ekstrakti antioksidativno učinkovitost v *in vitro* pogojih. Ekstrakti se po učinkovitosti med seboj razlikujejo glede na uporabljeno metodo.

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo preverili tudi z *in vivo* metodo, kjer smo na modelnem organizmu celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* določili znotrajcelično oksidacijo z uporabo barvila diklorofluorescein.

Vsi ekstrakti, z izjemo enega, so pokazali prooksidativno delovanje na celice, vendar so bile med njimi razlike, na kar je vplivala vrsta FS.

Za preiskovane ekstrakte EDOO smo tudi preverili soodvisnost med rezultati posameznih analiz v *in vitro* pogojih ter rezultati metode *in vivo* in le deloma našli pozitivno povezavo med rezultati omenjenih analiz.

7 VIRI

- 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: 101-114
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48, 4: 573-589
- Atlas R.M. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 1006-1007
- Balasundram N., Sundam K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99: 191-203
- Bandelj Mavsar D., Bešter E., Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Čalija D., Kanjir Ž., Levanič T., Valenčič V., Mazl Ž. 2005. Abc o 'Istrski belici'. Koper Znanstveno-raziskovalno središče: Labs. 2 str.
<http://www.zrs-kp.si/Projekti/rgfi/pic/ABC%20PROSPEKT%202005.pdf> (9.9.2009)
- Bation M., Pallegriani N. 2006. Total antioxidant capacity of olive oils. V: Olive oil and health. Quiles J.L., Ramirez-Tortosa M.C., Yaqoob P. (eds). Cambridge, CABI Publishing: 63-108
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., Lercker G. 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. Molecules, 12: 1679-1719
- 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
- Boskou D. 2008. Phenolic compounds in olives and olive oil. V: Olive oil: Minor constituents and health. Boskou D. (ed.). New York, CRC Press: 11-44
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology, 28:25-30
- Bučar-Miklavčič M. 2001. Deviškost še nič ne pomeni. Herbika, 2, 1: 20-23

- Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Sotlar M. 1997. Oljka in oljčno olje. Ljubljana, Kmečki glas: 142 str.
- Butinar B. 2001. Prehranski antioksidanti v oljčnih oljih slovenske Istre. *Herbika*, 2, 1: 24-28
- Butinar B. 2006. Antioxidants in virgin olive oils produced from two olive cultivars of Slovene Istria. *Annales: Series Historia naturalis*, 16, 2: 201-208
- Butinar B. 1999. Polifenoli v oljčnih oljih slovenske Istre letnika 94. *Annales: Series Historia naturalis*, 9, 2=17: 17-26
- Cai Q., Rahn R.O., Zhang R. 1997. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*, 119: 99-107
- Caponio F., Pasqualone A., Gomes T. 2002. Effects of conventional and microwave heating on the degradation of olive oil. *European Food Research and Technology*, 215: 114-117
- Codex standard for olive oils and olive pomace oils. CAC/RS 33-1981 (rev. 2-2003). 2003. V: *Codex Alimentarius*. Rome, FAO/WHO: 9 str.
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/88/CXS_033e.pdf
- Donko M. 1995. Antimikrobna aktivnost netreska. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14, 19, 46
- Eskin N. A. M., Przybylski R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. V: *Food shelf life stability: chemical, biochemical and microbiological changes*. Eskin N. A. M., Robinson D. S. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 175-206
- Frankel E.N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57: 51-55
- Gordon M.H. 1993. Natural antioxidants. V: *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Vol 1. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds.). London, Academic Press: 7-112
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Jurnal of the American Oil Chemist's Society*, 58: 966-968
- Halliwell B. 1996. Radikali - v bolezni in zdravju. *Kemija v šoli*, 8, 4: 10-13
- Hassan A.-G., Bedir E., Takamatsu S., Ferreira D., Khan I.A. 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 65: 2499-2505

- Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 6:2274-2279
- Häkkinen S. 2000. Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral dissertation. Kuopio, Kuopio University: 90 str.
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301.
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F. 2006. The antioxidative properties of holy basil and galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72: 446-456
- Košmelj K. 1991. Statistični modeli za ugotavljanje sistematičnih napak. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. *Kmetijstvo*, 57: 221-227
- Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Houlst J.R. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effect of lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology*, 37: 2859-2865
- Miyoshi N., Naniwa K., Yamada T., Osawa T., Nakamura Y. 2007. Dietary flavonoid apigenin is a potential inducer of intracellular oxidative stress: The role in the interruptive apoptotic signal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 466: 274-282
- Moure A., Franco D., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Lema J.M. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3890-3897
- Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M., Katzogiannos E. 2004. Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical Methods*, 61: 155-160
- Nissiotis M., Tasioula-Margari M. 2002. Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*, 77: 371-376
- Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalter B., Bartsch H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36: 1235-1247
- Pokorny J. 2007. Antioxidants in food preservation. V: Handbook of preservation. Rahman M.S. (ed.). New York, CRC Press: 309-338

Pravilnik o oljčnem olju. 1999. Uradni list Republike Slovenije, 9, 30: 3469-3500

Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302

Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254

Rota C., Chignell C.F., Mason R.P. 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 7/8: 873-881

Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147-176

Shahidi F., Naczki M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press: 489-490

SI-Stat podatkovni portal: Pridelava sadja v intenzivnih sadovnjakih in oljk v intenzivnih oljčnikih (ha, število dreves, t, t/ha), Slovenija, letno. 2008. Ljubljana. Statistični urad Republike Slovenije: 1 str.
http://www.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502404S&ti=Pridelava+sadja+v+intenzivnih+sadovnjakih+in+oljk+v+intenzivnih+olj%28nikih+%28ha%2C+%29Atevilov+dreves%2C+t%2C+t%2Fha%29%2C+Slovenija%2C+letno&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribijstvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2
(17.11.2009)

Singleton V. L., Rossi J. A. Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-shosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158

Trans-2-hexanal(6728-26-3). 2008. V: Chemical Book. 2008. (april 2010): 1str.
http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2164584_EN.htm

Tuck K. L., Hayball P. J. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 636-644

Valavanidis A., Nisiotou C., Papageorgiou Y., Kremli I., Savelas N., Zinieris N., Zygalki H. 2004. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2358-2365

Visioli F., Galli C., Caruso D. 2002. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 677-684

Vissers M. N., Zock P. L., Katan M. B. 2004. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58: 955-965

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Heleni Abramovič za vse nasvete in pomoč, ki mi jo je nudila v času izdelave diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Poloni Jamnik za nasvete in pomoč pri izvedbi analize antioksidacijske učinkovitosti z *in vivo* modelom.

Zahvaljujem se prof. dr. Rajku Vidrihu za pregled naloge.

Zahvaljujem se Petri Terpinc uni. dipl. inž. živ. tehn. za nasvete in pomoč pri izvedbi analize beljenje β - karotena.

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

Zahvaljujem se Niki Slokar za podatke analize HPLC.

Zahvaljujem se osebju iz laboratorija Labs d.o.o. v Izoli, ki so opravili analizo HPLC ter mi odstopili vzorce za analizo.

