

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vojko NIKOLIČ

**OKSIDATIVNA STABILNOST OLJA NAVADNEGA RIČKA
(*CAMELINA SATIVA*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

OXIDATIVE STABILITY OF *CAMELINA SATIVA* OIL

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Emoni razvojnem centru za prehrano d.o.o v Ljubljani in v laboratoriju Labs d.o.o v Izoli.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Abramovič, za recenzenta pa doc. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Recenzent: doc. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vojko Nikolič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 665.3 . 543.635.3(043)=863
KG rastlinska olja/olje navadnega rička/totrovo olje/*Camelina sativa*/proste maščobne kisline/fenolne spojine/tokoferoli/oksidativna stabilnost/peroksidno število/*p*-anizidinska vrednost
AV NIKOLIČ, Vojko
SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN OKSIDATIVNA STABILNOST OLJA NAVADNEGA RIČKA (*CAMELINA SATIVA*)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 48 str., 10 pregl., 12 sl., 52 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V raziskavi smo uporabili olje pridobljeno iz semen navadnega rička letnik 2005, ki so ga pridelali v okolici Otiškega vrha na Koroškem. Za spremljavo oksidativne stabilnosti smo ričkovo olje skladiščili 44 dni v temi pri temperaturi 50 °C in periodično določali vsebnost prostih maščobnih kislin, saponifikacijsko število, jodovo število, prisotnost primarnih (*PŠ*) in sekundarnih produktov oksidacije (*p-AV*) ter vsebnost fenolnih spojin in tokoferolov. Glede na vsebnost prostih maščobnih kislin ($0,54 \pm 0,01$) % in *PŠ* ($2,30 \pm 0,01$) mmol O₂ / kg je sveže olje navadnega rička ustrezalo pogojem za nerafinirana olja po slovenskem pravilniku o jedilnih oljih. V svežem olju smo določili skupne fenolne spojine (123 mg / kg) in tokoferole (751 mg / kg), z najbolj zastopanim γ homologom (710 mg / kg). Vsebnost fenolnih spojin in tokoferolov se je med skladiščenjem pri izbranih pogojih zmanjševala. Zanimiva je visoka korelacija ($R = -0,999$) med *PŠ* in vsebnostjo fenolnih spojin. Ekstrahirane fenolne spojine iz ričkovega olja so pokazale antioksidativno učinkovitost v lipidnem mediju.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 665.3 . 543.635.3(043)=863
CX oils vegetables/*Camelina sativa* oil/free fatty acids/phenolic compounds/tocopherols/oxidative stability/peroxide value/*p*-anisidine value
AU NIKOLIČ, Vojko
AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science Technology
PY 2006
TI OXIDATIVE STABILITY OF *CAMELINA SATIVA* OIL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 48 p., 10 tab., 12 fig., 52 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In our research we used the oil that has been produced from the seeds of *Camelina sativa*, year 2005, grown in the surroundings of Otiški vrh in Koroška region. For the determination of the oxidative stability, camelina oil has been stored for 44 days in the darkness at 50 °C. Furthermore, content of free fatty acids, saponification number, iodine value, presence of primary (*PŠ*) and secondary products of oxidation (*p-AV*), as well as the content of phenolic compounds and tocopherols, has been determined periodically. In view of the content of free fatty acids ($0,54 \pm 0,01$) % and *PŠ* ($2,30 \pm 0,01$) mmol O₂ / kg, fresh camelina oil has met the regulations for unrefined oils according to Slovenian regulations on quality of edible vegetable oils. Content of phenolic compounds (123 mg / kg) and tocopherols (751 mg / kg), with the most represented γ homologue (710 mg / kg), have been defined in fresh oil. The content of phenolic compounds and tocopherols has been lowering in the time of storing at selected conditions. What is of a great interest is a high correlation ($R = -0,999$) with *PŠ* and content of phenolic compounds. Extracted phenolic compounds from camelina oil have shown an antioxidant efficacy in a lipidic matter.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	
IX	
1	UVOD
1	
1.1 NAMEN NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MAŠČOBE	
4	
2.1.1 Triacilgliceroli	
4 2.1.2 Minorne gliceridne in negliceridne snovi	
6	
2.1.2.1 Fosfolipidi	6
2.1.2.2 Ogljikovodiki	
6	
2.1.2.3 Steroli	
6 2.1.2.4 Klorofili in karotenoidi	
6	
2.1.2.5 Fenolne spojine	
7	
2.1.2.6 Tokoferoli in tokotrienoli	
8	
2.2 MAŠČOBE V PREHRANI	10
2.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA / AVTOOKSIDACIJA	11
2.3.1 Razgradnja hidroperoksidov	
12	
2.4 DOLOČANJE OKSIDATIVNE ŽARKOSTI MAŠČOB	13
2.4.1 Kemijske metode	
13	

2.4.2	Določanje odpornosti maščob proti oksidativni žarkosti	
13		
2.4.2.1	Rancimat	
14		
2.5	ANTIOKSIDANTI	
14		
2.5.1	Delitev antioksidantov	15
2.5.2	Delovanje antioksidantov	16
2.5.3	Antioksidativna aktivnost fenolnih spojin	16
3	MATERIAL IN METODE	
18		
3.1	ZASNOVA RAZISKAVE	
18		
3.1.1	Karakterizacija svežega olja navadnega rička	18
3.1.2	Spremljava oksidativne stabilnosti olja ter vsebnosti fenolnih spojin in skupnih tokoferolov	
18		
3.1.3	Določitev antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin ekstrahiranih iz ričkovega olja	
18		
3.2	MATERIAL ZA RAZISKAVO	
19		
3.3	KEMIJSKE ANALIZE VZORCEV	19
3.3.1	Določanje peroksidnega števila	
19		
3.3.2	Določanje <i>p</i>-anizidinske vrednosti	20
3.3.3	Kislinsko število	
21		
3.3.4	Saponifikacijsko število	
22		
3.3.5	Jodovo število	
23		
3.3.6	Določanje skupnih fenolnih spojin v olju	24
3.3.6.1	Ekstrakcija	
24		
3.3.6.2	Folin-Ciocalteu metoda	24
3.3.6.3	Priprava umeritvene krivulje	24
3.3.6.4	Izračun vsebnosti skupnih fenolnih spojin	25

3.3.7 Rancimat metoda

26

3.3.8 Določanje vsebnosti tokoferolov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

26

4 REZULTATI

27

4.1 REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ VZORCA

27

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

38

5.1 RAZPRAVA

38

5.2 SKLEPI

42

6 POVZETEK

43

7 VIRI

44

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (White, 2000)	
5	
Preglednica 2: Sestava maščobnih kislin v olju navadnega rička	5
Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin, 1983)	
7	
Preglednica 4: Povprečna vrednost za vsebnost skupnih tokoferolov v nekaterih rastlinskih oljih (Gunstone, 1994)	
9	
Preglednica 5: Vrednosti za masno koncentracijo klorogenske kisline v epici, $\gamma_{k,k}$ in vrednosti za izmerjeno absorbanco, A	24
Preglednica 6: Vrednosti za saponifikacijsko, jodovo in kislinsko število olja navadnega rička	
27	
Preglednica 7: Vrednosti peroksidno število, <i>p</i> -anizidinsko vrednost, vsebnosti skupnih fenolnih spojin in skupnih tokoferolov v odvisnosti od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	31
Preglednica 8: Vsebnost tokoferolov v olju navadnega rička v odvisnosti od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	
34	
Preglednica 9 : Indukcijske periode vzorcev olja barvilnega rumenika brez dodanega ekstrakta in z dodanim ekstraktom določeni z Rancimatom pri 110 °C	37
Preglednica 10: Vrednosti za peroksidno število olja barvilnega rumenika brez dodatka in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin v odvisnosti od časa skladiščenja v temi, pri temperaturi 65 °C	
37	

KAZALO SLIK

Slika 1	Strukturna formula tokoferolov (Eitenmiller, 1997)	
10		
Slika 2	Strukturna formula sintetičnega antioksidanta BHT	
15		
Slika 3	Reakcije antioksidantov z lipidnimi radikali	16
Slika 4	Princip antioksidativnega delovanja fenolne spojine hidroksitirosola (Gunstone, 1984)	
17		
Slika 5	Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih olja navadnega rička	
25		
Slika 6	Odvisnost peroksidnega števila olja navadnega rička od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	
28		
Slika 7	Odvisnost <i>p</i> -anizidinske vrednosti olja navadnega rička od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	
29		
Slika 8	Vsebnosti skupnih fenolnih spojin v olju v odvisnosti od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	30
Slika 9	Vsebnost skupnih fenolnih spojin kot funkcija <i>PŠ</i>	
32		
Slika 10	Vsebnost skupnih fenolnih spojin kot funkcija <i>p-AV</i>	
33		
Slika 11	Vsebnosti tokoferolov v olju navadnega rička v odvisnosti od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	
35		
Slika 12	Preostanek antioksidantov v olju navadnega rička v odvisnosti od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHA	butil hidroksianisol
BHT	butil hidroksitoluen
DHA	dokozaheksaenojska kislina
DPA	dokozapentaenojska kislina
E_{ekstrakt}	zaščitni učinek fenolnih spojin
EPA	eikozapentaenojska kislina
HDL	lipoproteini visoke gostote
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IP	indukcijska perioda
$J\check{S}$	jodovo število
$K\check{S}$	kislinsko število
LDL	lipoproteini nizke gostote
$p-AV$	p -anizidinska vrednost
PG	propil galat
$P\check{S}$	peroksidno število
$S\check{S}$	saponifikacijsko število
TBHQ	terciarni hidroksitoluen
WHO	svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

Navadni riček (*Camelina sativa*) je starodavna kulturna rastlina in je imel v preteklosti pomembno mesto med poljščinami. Spada v družino križnic – *Brassicaceae*. Izvorna rastlina je divji riček, ki se kot plevel pojavlja v vzhodni Evropi in severozahodni Aziji. Arheološke raziskave so potrdile, da so ga gojili že v mlajši kameni in železni dobi na območjih ob Severnem morju in ob Renu. Od tam se je pridelava rička v monokulturi in v mešanici z lanom razširila po vsej Evropi. Zaradi neznanih razlogov se je pridelava v srednjem veku močno zmanjšala vse do začetka industrijske revolucije, ko so začeli ričkovo olje uporabljati kot industrijsko olje. Pridelovanje se je pri nas ohranilo predvsem na Koroškem. Zaradi nezahtevne pridelave (majhne potrebe po gnojenju, odpornost proti boleznim) in primernosti za ekološko predelavo postaja navadni riček v Evropi in Ameriki vedno bolj zanimiv (Mlakar Grobelnik in sod., 2003).

V Sloveniji (Koroška) pridobivajo ričkovo ali totrovo olje iz posušenega semena, ki ga zmeljejo in pomešajo z vodo v gosto rjavo zmes ali pogačo. Pogačo pražijo pri temperaturi 60 °C - 90 °C, dokler ne postane sipka in na otip suha. Iz nje s stiskalnico iztisnejo olje, ki ga pustijo stati približno dva tedna, da se zbistri, nato pa ga precedijo skozi gazo. Ričkovo olje je bistro, rumene do zeleno rumene barve, značilnega vonja in rahlo pekočega okusa (Mlakar Grobelnik in sod., 2003).

Olje navadnega rička se je tradicionalno uporabljalo kot domače zdravilo. Kot splošno krepilno sredstvo so ga predpisovali pri težavah zaradi rane na želodcu in dvanajsterniku, prav tako pa tudi v primerih raznih vnetij ter za oskrbo opeklin in ran (Rode, 2001).

Olje navadnega rička ima tudi zanimive tehnične lastnosti in ga je možno uporabiti kot nosilec za naravne pesticide, kot osnovo za ekološke barve in lake in ima podobno uporabnost, kot ga je imelo včasih laneno olje v industriji. V kozmetični industriji ga že uporabljajo za izdelavo pH nevtralnega mila, šamponov in kot dodatek različnim kremam. Z epoksidacijo spremenjeno olje lahko uporabljajo pri izdelavi razgradljivega PVC. Obstajajo tudi dobri rezultati poizkusov uporabe olja za biodizelsko gorivo. Možnosti uporabe navadnega rička niso izčrpane z izdelavo olja; stebela je možno uporabiti kot vir biomase ali celuloznih vlaken za izdelavo papirja. Ponekod so stebela uporabljali za izdelavo metel. Seme je visoko hranljivo in poleg olj vsebuje tudi do 30 % beljakovin. Zato je samo ali kot ostanek pridobivanja olja (pogače) primerno tudi za krmo (Rode, 2000).

Olje navadnega rička vsebuje 7-14 % nasičenih, 26-41 % enkrat nenasičenih ter kar 46-64 % večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Med nasičenimi maščobnimi kislinami

prevladujeta palmitinska in stearinska kislina, vsebuje pa tudi manjši delež sicer škodljive eruka kisline (3 %). Zaradi visoke vsebnosti esencialnih maščobnih kislin α -linolenske (n-3) in linolne (n-6) maščobne kisline ter visoke vsebnosti in stabilnosti tokoferolov, uvrščajo olje navadnega rička med funkcionalno hrano (Mlakar Grobelnik in sod., 2003).

Zaradi ugodne maščobno-kislinske sestave, je olje navadnega rička bogat vir omenjenih maščobnih kislin. Le-teh organizem sam ne more proizvajati, igrajo pa pomembno vlogo v zgradbi in lastnostih celičnih membran, njihovi prepustnosti in aktivnosti. Iz njih (linolenska kislina) organizem tvori biološko pomembne molekule (prostaglandin in njegovi derivati), ki sodelujejo pri nadzoru procesov kot je reumatoidni artritis, ekcem, multipla skleroza, bolezni srca in ožilja itd. (Mlakar Grobelnik in sod., 2003).

Maščobe so tako iz omenjenih vzrokov pomembna prehransko-fiziološka sestavina hrane, hkrati pa tudi tista komponenta, ki je najbolj podvržena oksidacijskim procesom kvara. Na hitrost avtooksidacije maščob vpliva sestava maščobnih kislin, stopnja nenasičenosti, prisotnost pro- in antioksidantov, prisotnost kisika, temperatura, svetloba in vsebnost vlage. Ker predstavlja olje navadnega rička sistem z visoko vsebnostjo večkrat nenasičenih maščobnih kislin, smo ga nameravali okarakterizirati glede na njegovo oksidativno stabilnost.

V zadnjih letih je bilo v svetu opravljenih malo raziskav o oksidativni stabilnosti olja navadnega rička. Eidhin in sod. (2003) je v svoji raziskavi spremljal oksidativno stabilnost olja navadnega rička med skladiščenjem pri različnih pogojih. Ugotovil je, da je olje navadnega rička manj stabilno kot večina rastlinskih olj, vendar bolj kot nekatera olja z visoko vsebnostjo α -linolenske kisline (laneno olje in ribje olje).

Opaziti je, da zanimanje za olje navadnega rička vse bolj narašča, predvsem zaradi raziskav na področju naravnih antioksidantov. Te spojine v olju navadnega rička predstavljajo predvsem tokoferoli (Zubr in Mathäus, 2002).

Vse večja ozaveščenost potrošnikov in težnje k bolj uravnoteženi in zdravi prehrani narekujejo razvoj in raziskave v smeri iskanja novih virov hrane oz. prehranskih dodatkov, naravnega izvora. Razlog temu so številne epidemiološke študije, ki kažejo na povezavo med uživanjem hrane in pijač z visoko vsebnostjo fenolnih spojin ter zmanjšanjem nastanka mnogih bolezni modernega življenja, ki jih povzroča oksidativni stres (Steinmetz in Potter, 1996).

1.3 NAMEN NALOGE

V okviru diplomskega dela smo nameravali v svežem olju navadnega rička določiti vsebnost prostih maščobnih kislin, morebitno prisotnost primarnih in sekundarnih produktov oksidacije ter vsebnost fenolnih spojin in tokoferolov. Zatem pokazati, kako se omenjeni parametri spreminjajo s časom skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C. Poleg tega smo nameravali iz olja ekstrahirati fenolne spojine in dokazati njihov antioksidativni učinek v lipidnem sistemu.

1.4 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da se kemijska sestava olja spreminja med skladiščenjem v temi pri 50 °C. Pričakujemo tudi, da bomo iz olja ekstrahirali fenolne spojine in dokazali njihov antioksidativni učinek.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MAŠČOBE

Pod pojmom maščobe smatramo masti in olja rastlinskega in živalskega izvora. Masti so pri sobni temperaturi trdne, olja pa tekoča. Sestavljajo jih triacilgliceroli, vsebujejo pa tudi t.i. negliceridne snovi (neumiljive snovi), prisotne v majhnih količinah, vendar lahko značilno vplivajo na fizikalne in kemijske lastnosti maščobe (Nawar, 1996).

Triacilgliceroli predstavljajo približno 95-98 % olja, ostalo (2-5 %) so negliceridne snovi, kjer gre za kompleksno mešanico različnih kemijskih spojin, katerih kvalitativna in kvantitativna sestava je zelo različna.

2.1.1 Triacilgliceroli

Triacilgliceroli so estri glicerola in maščobnih kislin. V molekuli triacilglicerola predstavljajo največji delež maščobne kisline. Maščobne kisline se med seboj razlikujejo po številu ogljikovih atomov v molekuli, nasičenosti oz. nenasičenosti ter številu in položaju dvojnih vezi. V naravnih maščobah prevladujejo maščobne kisline z ravno verigo in parnim številom ogljikovih atomov ter eno karboksilno skupino. V naravnih maščobah z nenasičenimi maščobnimi kislinami prevladuje *cis* oblika. (Nawar, 1996). Povprečna maščobno kislinska sestava nekaterih rastlinskih olj je podana v Preglednici 1. Vsebnost maščobne kisline je izražena kot utežni odstotek (%) glede na vsebnost vseh maščobnih kislin.

V Preglednici 2 so zbrani rezultati raziskav o sestavi maščobnih kislin v olju navadnega rička (Budini in sod., 1995; Eidhin in sod., 2003; Abramovič in sod., 2005; Zubr in sod., 1997).

Preglednica 1: Sestava maščobnih kislin v rastlinskih oljih (White, 2000)

vrsta rastlinskega olja	vsebnost maščobnih kislin / (%)						
	palmitinska (16:0)	stearinska (18:0)	oleinska (18:1) <i>n-9</i>	linolna (18:2) <i>n-6</i>	linolenska (18:3) <i>n-3</i>	arahidinska (20:0)	eruka (22:1) <i>n-9</i>
bombaževo	24,7	2,3	17,6	53,3	0,3	0,1	-
koruzno	12,2	2,2	27,5	57,0	0,9	0,1	-
sojino	11,0	4,0	23,4	53,2	7,8	0,3	-
sončnično	6,8	4,7	18,6	68,2	0,5	0,4	-
oljčno	13,7	2,5	71,7	10,0	0,6	0,9	-
arašidovo	11,6	3,1	46,5	31,4	-	1,5	-
ogrščično	3,9	1,9	64,1	18,7	9,2	0,1	-
laneno	4,8	4,7	19,9	15,9	52,7	-	-
repično	2,8	1,3	23,8	14,6	7,3	0,7	34,8

Preglednica 2: Sestava maščobnih kislin v olju navadnega rička

maščobne kisline	vsebnost maščobnih kislin / (%)			
	Budin in sod. (1995)	Eidhin in sod. (2003)	Abramovič in sod. * (2005)	Zubr in sod. (1997)
palmitinska (16:0)	5,7 – 8,4	5,5	6,43 ± 0,01	5,3 – 5,6
stearinska (18:0)	1,4 – 3,5	2,3	2,57 ± 0,01	2,3 – 2,7
oleinska (18:1) <i>n-9</i>	14,2 - 19,4	14,9	17,40 ± 0,30	14,0 – 16,9
linolna (18:2) <i>n-6</i>	19,0 - 24,0	15,8	16,90 ± 0,10	13,5 – 16,5
α-linolenska (18:3) <i>n-3</i>	27,1 - 34,7	38,9	35,20 ± 0,40	34,9 – 39,7
arahidinska (20:0)	**	0,4	1,24 ± 0,05	1,2 – 1,5
gondojska (20:1) <i>n-9</i>	12,3 - 14,7	16,2	14,90 ± 0,20	15,1 – 15,8
eruka (22:1) <i>n-9</i>	0,0 – 4,0	2,4	1,62 ± 0,03	2,6 – 3,0

* povprečna vrednost treh paralelk ± standardna deviacija

** ostali: 2,0 – 8,1 %

Med vsemi maščobnimi kislinami je v olju navadnega rička najbolj zastopana α -linolenska kislina. V povprečju je te kisline v olju 35 %. Običajna rastlinska olja imajo znatno nižjo vsebnost α -linolenske kisline (repično, ogrščično in sojino okoli 8 %; oljčno, koruzno ter sončnično približno 1 %). Olje navadnega rička vsebuje v povprečju 15 % gondojske kisline, ki je ostala olja ne vsebujejo. Rezultati omenjenih raziskav kažejo, da olje navadnega rička vsebuje okoli 2,2 % eruka kisline, kar je znatno pod najvišjo dovoljeno vrednostjo (5 %), ki jo določa Pravilnik o eruka kislini (2003). Eruka kislina je prisotna v semenih rastlin, ki tako kot navadni riček spadajo v družino križnic (*Brassicaceae*).

2.1.2 Minorne gliceridne in negliceridne snovi

2.1.2.1 Fosfolipidi

Rastlinska olja vsebujejo v glavnem dve vrsti fosfolipidov: lecitine in cefaline, ki so kemijsko pravzaprav triacilgliceroli, pri katerih je ena maščobna kislina nadomeščena s fosforjevo kislino.

2.1.2.2 Ogljikovodiki

Večina olj vsebuje nasičene in/ali nenasičene ogljikovodike, od katerih je v največjih količinah zastopan skvalen. Ogljikovodiki predstavljajo del neumljive frakcije, na vsebnost pa močno vpliva kultivar oljarice in tehnologija ekstrakcije.

2.1.2.3 Steroli

Steroli se v maščobah nahajajo v prosti obliki ali kot estri maščobnih kislin. Najbolj znan sterol v živalskih tkivih je holesterol, v rastlinskih tkivih pa fitosteroli, ki imajo pomembno vlogo pri preprečevanju koronarnih bolezni. Med fitosteroli, ki so najbolj zastopani v oljih so kampasterol, stigmasterol in sitosterol.

2.1.2.4 Klorofili in karotenoidi

Klorofili so zeleni pigmenti s porfirinsko strukturo in magnezijem v središču. Karotenoidi so lahko rumeni, rdeči ali vijolični. Karotenoide delimo v dve skupini: karoteni in ksantofili (Nawar, 1996). Vrsta in količina karotenoidov v rastlinskih oljih je odvisna od vrste in kultivarja oljarice, stopnje dozorelosti semen oz. plodov, dejavnikov rastišča, rafinacije in skladiščenja olja. Klorofili in karotenoidi imajo za stabilnost olja pomembno vlogo, saj lahko delujejo kot pro- ali kot antioksidanti (Cert in sod., 2000).

2.1.2.5 Fenolne spojine

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki se v rastlini sintetizirajo za zaščito pred sevanji (zlasti UV) ter obrambo pred boleznimi, škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki. Družina fenolnih snovi je zelo velika in pestra. To so spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več hidroksilnih spojin neposredno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več hidroksilnimi skupinami. Zanje so se uveljavila tudi imena polifenoli, rastlinski fenoli ali biofenoli. Sestavljajo dobršen del 'polarne frakcije', ki jo definiramo kot segment, pridobljen pri ekstrakciji iz plodov, semen ali olja z mešanico metanola in vode. V naši raziskavi smo z izrazom skupne fenolne spojine označili tiste sestavine, ki smo jih ekstrahirali z zmesjo metanola in vode ter določili s Folin-Ciocalteu reagentom. Pri poimenovanju fenolnih spojin se priporoča uporaba razdelitev po številu C-atomov v molekuli in je prikazana v Preglednici 3.

Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin, 1983)

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C_6	fenoli
7	C_6C_1	fenolne kisline
8	C_6C_2	fenilacetne kisline
9	C_6C_3	hidroksicimetne kisline fenilpropeni kumarini izokumarini
10	C_6C_4	naftokinoni
13	$C_6C_1C_6$	ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	stilbeni antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	flavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	lignani neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	biflavonoidi
n	$(C_6C_3)_n$	lignini
n	$(C_6)_n$	melanini
n	$(C_6C_3 C_6)_n$	kondenzirani tanini

Ker imajo fenolne spojine antioksidativni učinek, prispevajo k večji oksidativni stabilnosti olja. Olju dajejo tipičen grenak okus, prispevajo k barvi olja, zato je njihova vsebnost v oljih pomemben dejavnik pri oceni senzorične kakovosti olj (Angerosa in sod., 1995).

Med rastlinskimi olji ugotavljajo prisotnost fenolnih spojin predvsem v oljčnem olju. Vsebnost fenolnih spojin, ki so jo določili v oljčnem olju je zelo različna. Vrednosti se gibljejo v območju med 50 mg / kg in 500 mg / kg, v nekaterih primerih celo do 1000 mg / kg. Med olji, ki so pridobljena iz semen rastlin, ki tako kot navadni riček pripadajo družini križnic, je Vuorela s sodelavci (2003) v olju oljne repice (*Brassica rapa*), ki so ga dobili s stiskanjem pri temperaturi 100 °C in zvišanem pritisku, določil vsebnost skupnih fenolnih spojin 439 mg / kg (izraženo kot sinapinska kislina). Koski s sodelavci (2003) je v olju oljne ogrščice (*Brassica napus*), ki so ga prav tako dobili s stiskanjem pri zvišani temperaturi in pritisku, določil vsebnost skupnih fenolnih spojin 1066 mg / kg (izraženo kot kavna kislina). V nam dostopni literaturi nismo zasledili podatkov, ki bi potrdili, da olje navadnega rička vsebuje fenolne spojine.

2.1.2.6 Tokoferoli in tokotrienoli

To je skupina v maščobah topnih 6-hidroksi aromatskih spojin. Gre za štiri tokoferole (α -, β -, γ -, δ -) in štiri tokotrienole (α -, β -, γ -, δ -). Strukturna formula tokoferolov je prikazana na Sliki 1. Tokoferoli imajo nasičeno stransko verigo. Tokotrienoli imajo v stranski verigi dvojne vezi na mestih 3', 7' in 11'.

Biološka aktivnost posameznih tokoferolov je odvisna od lege in števila metilnih skupin na aromatskem obroču ter od konfiguracije ob asimetričnih ogljikovih atomih v stranski verigi (Eitenmiller, 1997). V primerjavi z ostalimi homologi je biološko najbolj aktiven α -tokoferol (vitamin E). Njegova biološka aktivnost je dvakrat večja od β in δ homologov ter 100 kart večja od γ homologa.

Ugotovili so, da je antioksidativno delovanje pri nižjih temperaturah bolj učinkovito pri α -tokoferolu, temu sledijo $\beta > \gamma > \delta$. Pri povišanih temperaturah (60 °C do 100 °C) pa se antioksidativna moč obrne in je zaporedje učinkovitosti naslednje $\delta > \gamma > \alpha > \beta$.

Naravni tokoferoli se nahajajo v rastlinskih tkivih. Zlasti veliko jih vsebujejo rastlinska olja. V Preglednici 4 je prikazana vsebnost skupnih tokoferolov v nekaterih jedilnih oljih. Dober vir tokoferolov so predvsem sojino in palmino olje ter olje pšeničnih kalčkov. Vsebnost skupnih tokoferolov med katerimi prevladuje γ -tokoferol v sojinem olju je okoli 1200 mg / kg. Vsebnost skupnih tokoferolov z najbolj zastopanim α homologom v olju

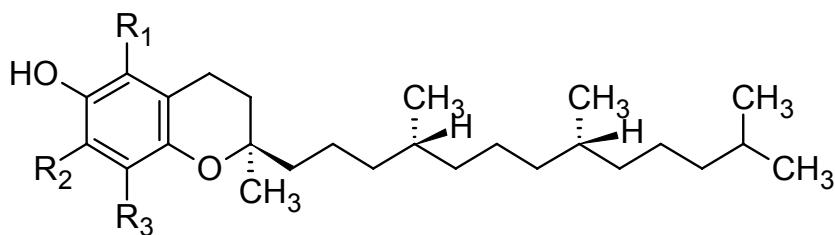
pšeničnih kalčkov je do 2500 mg / kg. Vsebnost posameznega homologa lahko uporabijo za ugotavljanje pristnosti oziroma potvorbe olja.

Zubr in Matthäus (2002) sta v svoji raziskavi določila vsebnost tokoferolov v olju navadnega rička, ki so ga pridelali v različnih klimatskih pogojih. Med preiskovanimi vzorci olja navadnega rička sta določila vsebnosti skupnih tokoferolov v območju med 695 mg / kg in 994 mg / kg. Ugotovila sta, da je v ričkovem olju najbolj zastopan γ -tokoferol. Vrednosti za vsebnost γ -tokoferola v vzorcih olja navadnega rička so bile od 651 mg / kg, vrednosti za vsebnost α -tokoferola v območju 14 mg / kg do 46 mg / kg, vrednosti za vsebnost δ -tokoferola v območju 15 mg / kg do 30 mg / kg, medtem ko β -tokoferola v ričkovem olju niso določili.

Preglednica 4: Povprečna vrednost za vsebnost skupnih tokoferolov v nekaterih rastlinskih oljih (Gunstone, 1994)

Vrsta olja	Vsebnost tokoferolov / (mg / kg)			
	α	β	γ	δ
bombaževo	389	-	387	-
koruzno	112	50	602	19
sojino	75	15	797	266
sončnično	487	-	51	8
oljčno	119	-	7	-
arašidovo	130	-	214	21
palmino	256	-	316	70
ričkovo*	33,4	-	758	22,9
pšenični kalčki	1330	710	260	271
sezamovo	136	-	290	-
repično	210	1	420	-

* Zubr in sod., 2002



R1	R2	R3	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α- tokoferol
CH ₃	H	CH ₃	β-tokoferol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tokoferol
H	H	CH ₃	δ-tokoferol

Slika 1: Strukturna formula tokoferolov (Eitenmiller, 1997)

2.2 MAŠČOBE V PREHRANI

Maščobe so zaradi nekaterih svojih komponent, esencialnih maščobnih kislin, v maščobah topnih vitaminov (A, D, E in K), antioksidantov (tokoferoli, polifenoli), življenjskega pomena, čeprav se še marsikje obravnava maščobe kot sestavino hrane, ki se jo je potrebno izogibati. Prehransko fiziološka kakovost maščob je različna in odvisna od izvora oziroma sestave maščob. Prekomerno uživanje maščob v vsakdanji prehrani povečuje tveganje za nastanek debelosti, bolezni srca in ožilja, nekaterih vrst raka ter drugih civilizacijskih bolezni. Pri tem mislimo predvsem na zaužite nasičene maščobne kisline, ki povečujejo koncentracijo holesterola v krvi. Zato so v prekomernih količinah v vsakdanji prehrani nezaželene. Večkrat nenasičene maščobne kisline so pomembne predvsem zaradi obratnega delovanja, saj znižujejo koncentracijo holesterola v krvi. n-6 maščobne kisline znižujejo lipoproteine nizke gostote (LDL) in lipoproteine visoke gostote (HDL) ter delujejo antitrombogeno, n-3 maščobne kisline pa znižujejo LDL in zvišujejo HDL ter znižujejo koncentracijo triacilglicerolov v plazmi in so antitrombogene (Simopoulos, 1999).

Večkrat nenasičene maščobne kisline so podvržene hitri peroksidaciji, zato ne smemo pretiravati z njihovim uživanjem. Kot je bilo omenjeno že v uvodnem delu, esencialnih maščobnih kislin telo ne more sintetizirati samo, zato jih moramo v organizem vnesti s

hrano. Esencialni maščobni kislini sta linolna (18:2 n-6) in α -linolenska (18:3 n-3) kislina. Derivate esencialnih maščobnih kislin imenujemo pogojno esencialne maščobne kisline. Te so: arahidonska (20:4 n-6), dokozaheksaenojska, DHA (22:6 n-3), eikozapentaenojska, EPA (20:5 n-3) in dokozapentaenojska, DPA (22:5 n-3) maščobna kislina (Hlastan Ribič, 2002).

Maščobne kisline iz družin n-3 in n-6 imajo pomembno vlogo pri rasti in razvoju možganov ter živčevja, vplivajo na permeabilnost in fluidnost bioloških membran, imajo pomembno vlogo kot prekursorji eikozanoidov in pri strukturi celičnih membran (Hlastan Ribič, 2002). Optimalno razmerje med n-6 in n-3 naj bi bilo po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) med 5:1 do 10:1.

Prehranski viri esencialnih maščobnih kislin so predvsem ribe in ribja olja. Bogat vir n-3 maščobnih kislin pa so še različna rastlinska olja, olja iz oreškov, semen in zrn, zelena listnata zelenjava in stročnice (Raper in sod., 1998).

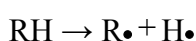
2.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA / AVTOOKSIDACIJA

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, kar ima za posledico tako poslabšanje senzoričnih lastnosti kot tudi prehranske vrednosti živila. Oksidacijo maščob najbolj učinkovito preprečimo z ustrezno predelavo, tj. predelavo, pri kateri so izgube naravno prisotnih antioksidantov (polifenoli, tokoferoli,..) najmanjše, z odstranitvijo kovin, odsotnostjo kisika in svetlobe, nizkimi temperaturami ter z dodatkom antioksidantov (Frankel, 1996).

Avtooksidacija je verižna reakcija prostih radikalov. Mehanizem oksidacije ima tri faze:

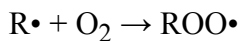
a) Inicijacija

Lipidno peroksidacijo sproži katerakoli spojina, ki je dovolj reaktivna, da odvzame vodikov atom iz metilenske skupine (-CH₂-) lipida (RH). Odstranitev vodika poteče na ogljikovem atomu ob dvojni vezi.

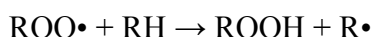


b) Propagacija

Nastali prosti radikal ($R\bullet$) se veže s kisikom, kar vodi do nastanka peroksilnega radikala ($ROO\bullet$).

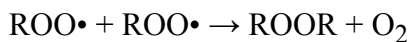
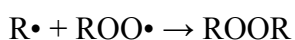
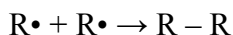


Peroksilni radikal nato reagira z novo molekulo lipidne molekule (RH), pri čemer se tvori hidroperoksid ($ROOH$) in prosti radikal ($R\bullet$), s čimer se nadaljuje verižna reakcija. Prosti radikali se v tej fazi tvorijo brez začetnih aktivatorjev.



c) Terminacija

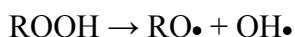
Reakcija se zaključi, ko prosti radikali reagirajo med seboj, kar vodi do nastanka neaktivnih produktov. Nastane stabilna neradikalna mešanica. Zaključne reakcije ustavijo ponavljajoče reakcije prostih radikalov značilne za propagacijsko stopnjo (Madhavi in sod., 1995).



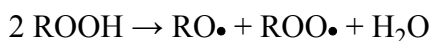
2.3.1 Razgradnja hidroperoksidov

Primarni produkti oksidacije maščob, hidroperoksidi so nehlapni, brez vonja in okusa, zato v hrani še ne puščajo okusa po žarkem. Ne zaznamo jih, dokler ne dosežejo določene koncentracije in se začnejo cepiti v spojine s krajšimi verigami. V tej stopnji lahko pride do dveh možnih cepitev:

- monomolekularne ali homolitske cepitve O-O vezi, kjer nastanejo radikali, ki lahko napadejo ostale hidroperoksidi in nenasičene maščobne kisline (Madhavi in sod., 1995)



- bimolekularne cepitve hidroperoksidov



Alkoksilni radikali (RO•) nato vstopajo v nadaljnje reakcije, pri čemer nastanejo spojine z neprijetnim žarkim okusom in vonjem: alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, ogljikovodiki in laktoni (Frankel, 1984).

2.4 DOLOČANJE OKSIDATIVNE ŽARKOSTI MAŠČOB

Oksidativno žarkost maščob in stabilnost oz. odpornost maščobe proti pojavu žarkosti določamo s fizikalnimi in kemijskimi metodami. Osnova metod za spremljanje oksidativne žarkosti olj in masti, je dejstvo da se maščoba preko številnih stopenj in produktov (peroksidi, hidroperoksidi) oksidira in pretvori v aldehide, ketone, alkohole in ostale sekundarne produkte, ki so nosilci žarkih arom (Frankel, 1984).

2.4.1 Kemijske metode

Obstaja veliko kemijskih metod za spremljanje oksidativne stabilnosti. Pri našem delu smo za spremljanje oksidativne stabilnosti merili peroksidno število in *p*-anizidinsko vrednost. Najpogostejše metode določanja peroksidnega števila temeljijo na jodometrični titraciji, pri kateri določimo količino joda, ki ga iz kalijevega jodida sprostito peroksidi prisotni v olju. Peroksidno število je dober pokazatelj kakovosti maščob v zgodnji fazi oksidacije. Peroksidi in hidroperoksidi so brez okusa in zelo nestabilni, zato je njihova prisotnost v olju zanesljiv pokazatelj, da bo prišlo do pojava arome po žarkem Frankel, 1984).

p-anizidinska vrednost je merilo za vsebnost aldehidov kot sekundarnih produktov oksidacije prisotnih v olju. Metoda določanja *p*-anizidinske vrednosti je najbolj primerna za oceno kvalitete starih olj.

2.4.2 Določanje odpornosti maščob proti oksidativni žarkosti

Na voljo je vrsta metod za določanje odpornosti maščob proti oksidativni žarkosti. Odpornost maščobe proti oksidativni žarkosti je definirana kot čas, ki je potreben za doseg kritične točke oksidacije (indukcijska perioda).

2.4.2.1 Rancimat

Pri tej metodi olje prepihujemo z zrakom pri visokih temperaturah (do 130 °C). Zrak vodimo v posodo z destilirano vodo in spremljamo napredovanje oksidacije z merjenjem elektrolitske prevodnosti vodne raztopine. Instrument podaja rezultate v obliki grafov, ki prikazujejo odvisnost elektrolitske prevodnosti od časa. Nagel skok elektrolitske prevodnosti ob dosegu indukcijske periode je posledica zvišane vsebnosti predvsem hlapnih karboksilnih kislin kot končnih produktov oksidacije (Läubli in sod., 1988).

Rancimat se veliko uporablja v industriji jedilnih olj in indukcijske periode, dobljeni z Rancimatom so navedeni v specifikacijah olj. Rancimat sestavljata dve, z električnim kablom povezani ločeni enoti, kar omogoča ločitev reakcijske posode od delovnega laboratorija, saj s tem ne prihaja do uhajanja vonjav v laboratorij. Povezava z LCD displejem omogoča prikaz parametrov merjenja; instrument ima tudi termostatsko kontroliran ogrevalni del in vodoodporno tipkovnico, kjer nastavljamo parametre merjenja. Mikroprocesor omogoča grafični prikaz indukcijske faze.

Rancimat 679, izdelovalca Methrom, Švica, ima široko območje delovanja: Od 50 ° do 200 °C. Olje segrejemo na izbrano temperaturo, hlapne komponente (sproščene karboksilne kisline) s pomočjo mehurčkov zračnega toka vodimo v destilirano vodo in merimo elektrolitsko prevodnost. Istočasno lahko določamo šest vzorcev. Instrument kontinuirno riše krivulje prevodnosti v odvisnosti od časa šestih preiskovanih vzorcev in na osnovi močnega povečanja naklona krivulje, ki predstavlja konec indukcijske faze, beleži indukcijske čase. Čas, ki poteče od začetka testa do te točke, je indukcijska perioda. V Rancimatu pospešimo oksidacijo vzorca in na ta način dobimo podatek o stabilnosti olja. Metoda ima visoko ponovljivost. Na indukcijski čas vpliva temperatura določanja. Če temperaturo povečamo za 10 °C, se indukcijski čas zmanjša za polovico. (Läubli in sod., 1988).

2.5 ANTIOKSIDANTI

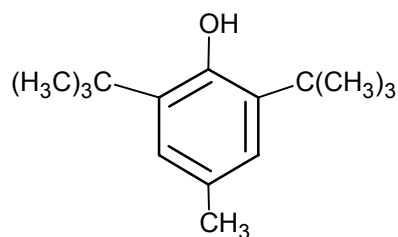
Antioksidanti so snovi, ki jih uporabljamo v izdelkih z maščobami in olji, da bi upočasnili ali preprečili procese oksidacije, ki jo spremljajo spremembe senzoričnih lastnosti, barve in teksture.

2.5.1 Delitev antioksidantov

Po izvoru delimo antioksidante na naravne in sintetične. Sintetične antioksidante pridobivajo s kemijsko sintezo. So zelo učinkoviti, vendar je njihova glavna pomanjkljivost škodljivo vplivanje na zdravje, zato je njihova uporaba količinsko omejena in določena s predpisi.

Sintetični antioksidanti, ki se najpogosteje uporabljajo so:

- 3- terciarni butil -4- hidroksianizol ali BHA
- 2,6- di-terciarni butil -p- hidroksi toluen ali BHT
- 2- terciarni butil – hidrokinon ali TBHQ
- propil galat (PG)



Slika 2 : Strukturna formula sintetičnega antioksidanta BHT

Zanimanje za naravne antioksidante se je v zadnjih letih precej povečalo ravno zaradi omenjenih škodljivih učinkov sintetičnih antioksidantov in njihove s pravilniki omejene uporabe. Številne rastline vsebujejo antioksidativne komponente, vendar le nekatere med njimi tudi dejansko služijo za pridobivanje naravnih antioksidantov. Med naravne antioksidante štejemo tokoferole, polifenole, karotene, askorbinsko kislino in ekstrakte začimb. Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin, ki so jih pridobili iz naravnih virov, dokazujejo rezultati številnih raziskav (Kikuzaki in sod., 2002; Škrget in sod., 2005).

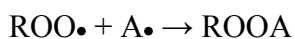
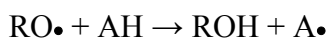
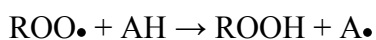
V živilstvu je uporaba tokoferolov in polifenolov kot antioksidantov v glavnem omejena na področje olj, masti in živil z določeno vsebnostjo maščob, tako rastlinskega kot živalskega izvora.

2.5.2 Delovanje antioksidantov

Antioksidanti delujejo tako, da se vključujejo v eno ali več stopenj avtooksidacije tj. iniciacijo, verižno reakcijo prostih radikalov in terminacijo. Večina antioksidantov deluje kot lovilci prostih radikalov in zaradi svoje fenolne strukture, delujejo kot donorji vodika ali elektronov.

2.5.3 Antioksidativna aktivnost fenolnih spojin

Fenolne spojine imajo močne antioksidativne lastnosti. Avtooksidacijo nenasičenih maščobnih kislin zavirajo tako, da odcepijo vodik iz fenolne –OH skupine. Pri tem nastane fenoksilni radikal, A^\bullet , ki je relativno stabilen. Odcepljeni vodikov atom se hitro poveže z lipidnim radikalom. S tem se prekine verižna reakcija prostih radikalov in tako zaustavi reakcija oksidacije lipidov (Shahidi, 1995). Slika 2 prikazuje reakcije fenolnih antioksidantov z lipidnimi radikali.



ROOH = hidroperoksid

ROO \bullet = alkil peroksidni radikal

RO \bullet = alkoksilni radikal

AH = antioksidant

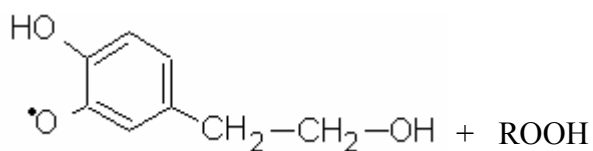
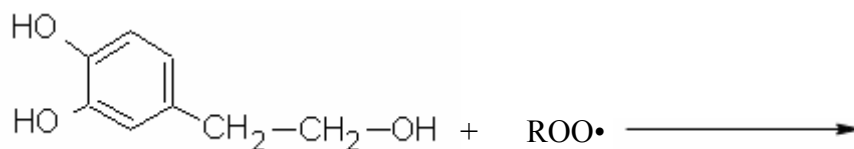
A \bullet = radikal antioksidanta

Slika 3: Reakcije antioksidantov z lipidnimi radikali

Učinkovitost antioksidantov je tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Pri tem nastali fenoksilni radikal, A^\bullet , ne sme sprožiti novih radikalskih reakcij, niti se hitro oksidirati.

Radikali fenolnih antioksidantov so relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča.

Na Sliki 4 je prikazano antioksidativno delovanje fenolne spojine hidroksitirosola.



Slika 4: Princip antioksidativnega delovanja hidroksitirosola (Gunstone, 1984)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZASNOVA RAZISKAVE

3.1.1 Karakterizacija svežega olja navadnega rička

Svežemu olju navadnega rička smo določili kislinsko število, jodovo število, saponifikacijska število, peroksidno število, *p*-anizidinsko število, izvedli ekstrakcijo fenolnih spojin ter določili vsebnost skupnih fenolnih spojin in skupnih tokoferolov.

3.1.2 Spremljava oksidativne stabilnosti olja ter vsebnosti fenolnih spojin in skupnih tokoferolov

Oksidativno stabilnost olja ter vsebnost fenolnih spojin in skupnih tokoferolov v olju pri 50 °C smo spremljali na naslednji način: olje smo zatehtali (50 g) v čaše volumna 100 mL, jih pokrili z urnim steklom in dali v peč za 44 dni na temperaturo 50 °C. V izbranih časovnih intervalih smo odvzeli vzorce in jim določali peroksidno število, *p*-anizidinsko število, kislinsko število, vsebnost skupnih in posameznih tokoferolov ter izvedli ekstrakcijo fenolnih spojin za določitev vsebnosti fenolnih spojin. Ekstrakte smo do analize hranili pri temperaturi -5 °C.

3.1.3 Določitev antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin ekstrahiranih iz ričkovega olja

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin ekstrahiranih iz ričkovega olja smo ugotavljali na naslednji način: iz svežega ričkovega olja (~5g) smo ekstrahirali skupne fenolne spojine, po sušenju ekstrakta na rotavaporju, smo posušen ekstrakt raztopili v enem mililitru etanola. 0,9 mL etanolne raztopine ekstrahiranih fenolnih spojin smo dodali k 55 g olja barvilnega rumenika (*Carthamus tinctorius*) (SIGMA – ALDRICH), ki po zagotovilih proizvajalca ne vsebuje antioksidantov. Koncentracija fenolnih spojin v tako pripravljenei zmesi olje + ekstrakt fenolnih spojin je bila 11 mg fenolnih spojin na kg olja.

Zaščitni učinek ekstrahiranih fenolnih spojin na oksidativno stabilnost lipidnega sistema smo spremljali z dvema preizkusoma določanja oksidativne stabilnosti.

V prvem primeru smo olje barvilnega rumenika (15 g) brez dodatka in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin 14 dni skladiščili v čašah (50 mL) pokritih z urnim steklom, v

temi pri temperaturi 65 °C. Periodično smo v 7 dnevnih intervalih odvzeli vzorce in jim določali peroksidno število. V drugem primeru smo zaščitni učinek dokazali z Rancimat metodo tako, da smo izmerili indukcijsko periodo olja barvilnega rumenika brez in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin. Zaščitni učinek ekstrahiranih fenolnih spojin na oksidativno stabilnost lipidnega sistema, E_{ekstrakt} smo izrazili kot:

$$E_{\text{ekstrakt}} = \frac{IP_{\text{ekstrakt}} - IP}{IP} \times 100\% \quad \dots(1)$$

IP_{ekstrakt} ...vrednosti indukcijske periode za olje barvilnega rumenika z dodanim ekstraktom fenolnih spojin iz olja navadnega rička
 IPvrednost indukcijske periode za olje barvilnega rumenika brez dodanega antioksidanta.

3.2 MATERIAL ZA RAZISKAVO

Za raziskavo smo uporabili olje pridobljeno iz semen navadnega rička (*Camelina sativa*) letnik 2005, ki so ga pridelali v okolici Otiškega vrha na Koroškem. To je nerafinirano olje. Po stiskanju sledi zgolj filtracija. Do začetka analiz smo olje tri tedne hranili v hladilniku (8 °C) v temni steklenici, oviti v Alu-fix folijo.

Vsi reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri analiznih metodah so bili analitske čistoče.

3.3 KEMIJSKE ANALIZE VZORCEV

3.3.1 Določanje peroksidnega števila

Peroksidno število je definirano kot množina O₂ (mmol) v kilogramu maščobe. Metoda določanja je povzeta po AOAC Official Method 965.33.

a) Postopek

Odtehtamo 5 gramov olja v 250 mL erlenmajerico in vzorcu dodamo 25 mL zmesi očetne kisline in kloroforma v razmerju (3 : 2). Zmes mešamo dokler se olje ne raztopi. Raztopini dodamo 1,0 mL nasičene raztopine kalijevega jodida, zmes premešamo in pustimo stati v temi točno dve minuti. Sproščeni jod titriramo s standardno raztopino natrijevega tiosulfata ($c = 0,1 \text{ mol / L}$). Kot indikator uporabimo raztopino škrobovice. Vzporedno s tem

poskusom opravimo še slepi poskus, v katerem ravnamo enako, le da v tem primeru ne uporabimo vzorca olja.

b) Peroksidno število izračunamo iz zveze:

$$P\check{S} = \frac{(V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} - V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (S.V.)}}) \cdot c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 1000}{2 \cdot m} \quad \dots(2)$$

$P\check{S}$ peroksidno število izraženo v (mmol O₂ / kg)

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$...poraba natrijevega tiosulfata za titracijo vzorca (mL)

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (S.V.)}}$... poraba natrijevega tiosulfata za titracijo slepega vzorca (mL)

$c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$...koncentracija natrijevega tiosulfata (mol / L)

mmasa vzorca (g)

c) Peroksidno število smo določali v treh paralelkah, povprečna napaka določitve je znašala ± 0,5 mmol O₂ / kg.

3.3.2 Določanje *p*-anizidinske vrednosti

p-anizidinska vrednost (*p-AV*) je definirana kot 100-kratna absorbanca raztopine, ki je posledica reakcije 1 g maščobe v 100 mL mešanice topila, merjene pri 350 nm v 10mm celici pri pogojih določanja. Metoda določanja je povzeta po IUPAC Method 2.504.

a) Postopek

2-3 grame olja zatehtamo v 25 mL bučko in s heksanom dopolnimo do oznake in pomerimo absorbanco (*Ab*) pri valovni dolžini 350 nm. Pri tem uporabimo topilo za slepi vzorec. Nato odpipetiramo 5 mL raztopine olja v heksanu v 10 mL epruveto. V drugo 10 mL epruveto odpipetiramo 5 mL topila in v vsako od 10 mL epruвет dodamo 1mL reagenta *p*-anizidina (2,5 g *p*-anizidina / L ledocetne kisline) in premešamo. Po natanko 10 minutah izmerimo absorbanco (*As*) pri valovni dolžini 350 nm in uporabimo za slepi vzorec vsebino iz druge epruvete.

p-anizidinsko vrednost izračunamo po enačbi :

$$p-AV = 25 \cdot \frac{(1,2 \cdot As - Ab)}{m} \quad \dots(3)$$

p-AV...para anizidinska vrednost

As.. ...absorbanca vzorca pri 350 nm z dodanim *p*-anizidinom

Ab....absorbanca vzorca pri 350 nm brez dodatka *p*-anizidina

m.....masa vzorca (g)

c) *p*-anizidinsko vrednost smo določali v dveh paralelkah. Povprečna napaka določitve je znašala $\pm 0,4$.

3.3.3 Kislinsko število

Kislinsko število je definirano kot masa kalijevega hidroksida (mg), ki nevtralizira proste maščobne kisline v 1,0 g maščobe. Modificirana metoda je povzeta po ISO 660.

a) postopek

2,0 do 5,0 g olja raztopimo v 10 mL zmesi etanola in etra (1:1), zmesi dodamo nekaj kapljic fenolftaleina ter titriramo s standardno raztopino KOH ($c = 0,1 \text{ mol / L}$) do pojava rožnato rdeče barve.

b) Kislinsko število, izraženo kot % oleinske kisline:

$$K\check{S} = \frac{100 \cdot V_{\text{KOH}} \cdot c_{\text{KOH}} \cdot M}{1000 \cdot m} \quad \dots(4)$$

KŠ.....kislinsko število

V_{KOH} volumen porabljenega kalijevega hidroksida za titracijo vzorca (mL)

c_{KOH} koncentracija raztopine kalijevega hidroksida (mol /L)

m.....masa vzorca (g)

M.....molska masa oleinske kisline (g / mol)

c) Kislinsko število smo določali v treh paralelkah. Povprečna napaka določitve je znašala 0,01 %

3.3.4 Saponifikacijsko število

Saponifikacijsko število je definirano kot masa kalijevega hidroksida (mg), ki ga potrebujemo za popolno hidrolizo 1,0 g masti ali olja. Metoda je povzeta po AOAC Official Method 920.160.

a) Postopek

V bučko, ki je opremljena s povratnim hladilnikom, odtehtamo 2,0 g olja. Olju dodamo 25,0 mL etanolne raztopine kalijevega hidroksida ($c = 0,5 \text{ mol / L}$) in segrevamo bučko na vodni kopeli, dokler se zmes ne zbistri. Bučko ohladimo, notranje stene speremo z destilirano vodo in titriramo prebitno množino kalijevega hidroksida s standardno vodno raztopino HCl ($c = 0,5 \text{ mol / L}$) ob fenolftaleinu kot indikatorju. Vzoredno izvedemo na enak način t.i. slepi poskus, le da v tem primeru ne dodamo maščobe.

b) Saponifikacijsko število izračunamo iz zveze:

$$SS\check{=} = \frac{(V_{\text{HCl(S.V.)}} - V_{\text{HCl}}) \cdot c_{\text{HCl}} \cdot 56,1053}{m} \quad \dots(5)$$

$SS\check{}$saponifikacijsko število

$V_{\text{HCl(S.V.)}}$...poraba HCl za titracijo slepega vzorca (mL)

V_{HCl} poraba HCl za titracijo vzorca (mL)

$c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$...koncentracija raztopine HCl (mol / L)

m masa vzorca (g)

56,1053...vrednost, ki ustreza molni masi kalijevega hidroksida

c) Saponifikacijsko število smo določali v treh paralelkah. Napaka določitve je znašala ± 1 .

3.3.5 Jodovo število

Jodovo število je definirano kot masa joda (g), ki se adira na 100 g maščobe. Metoda je povzeta po AOAC Official Method 920.185.

a) postopek

Odtehtamo 0,5 g olja v erlenmajerico z brušenim zamaškom in mu dodamo 15 mL kloroforma. Ko se olje raztopi, dodamo mešanici 25 mL raztopine jodovega bromida v očetni kislini. Raztopino premešamo in pustimo stati v temi 30 minut. Nato dodamo 20 mL vodne raztopine kalijevega jodida in premešamo. Notranje stene erlenmajerice speremo z destilirano vodo in raztopino titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata ($c = 0,1 \text{ mol / L}$) do bledorumene barve. Nato dodamo raztopini nekaj mL škrobovice in nadaljujemo s titracijo, dokler se raztopina ne razbarva. Vzoredno izvedemo še slepi poskus, tako, da damo v erlenmajerico 15,0 mL kloroforma in 25 mL raztopine jodovega bromida v očetni kislini ter zmes pustimo stati v temi 30 minut, nato pa ravnamo enako kot pri vzorcu.

b) Jodovo število izračunamo iz zveze:

$$J\check{S} = \frac{(V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{S.V.})} - V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}) \cdot c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 12,6905}{m} \quad \dots(6)$$

$J\check{S}$jodovo število

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{s.v.})}$... poraba natrijevega tiosulfata za titracijo slepega vzorca (mL)

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$... poraba natrijevega tiosulfata za titracijo vzorca (mL)

$c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$... koncentracija raztopine natrijevega tiosulfata (mol / L)

mmasa vzorca (g)

12,6905.....vrednost, ki ustreza desetinki atomske mase joda

c) Jodovo število smo določali v treh paralelkah. Napaka določitve je znašala ± 1

3.3.6 Določanje skupnih fenolnih spojin v olju

3.3.6.1 Ekstrakcija

5 gramov olja smo raztopili v 50 mL heksana in ekstrahirali s 3x po 20 mL 80 % metanola, nato ekstrakte združili in odparili topilo v rotavaporju pri temperaturi 30 °C. Suhi preostanek smo raztopili v 2 mL metanola.

3.3.6.2 Folin-Ciocalteu metoda

Določitev po Folin-Ciocalteu metodi temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju ob pomoči reagenta (fosfomolibdenska-fosfovolframova kislina) v modro obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo pri 765 nm. Postopek določitve je bil opravljen po modificirani metodi opisani v literaturi (Gutfinger, 1981) na naslednji način: odvzeli smo 0,1 mL metanolnega ekstrakta, mu dodali 0,125 mL Folin-Ciocalteu reagenta (1mL FC:2mL vode) in mešali tri minute. Nato smo dodali 0,125 mL natrijevega karbonata (20% raztopina), dopolnili z vodo do 1 mL (0,65 mL) in centrifugirali štiri minute pri 5000 obratov / min. Po 40 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm proti slepem vzorcu. Slepi vzorec smo pripravili po istem postopku, brez dodanega reagenta. Vsako določitev absorbance smo opravili v dveh ponovitvah.

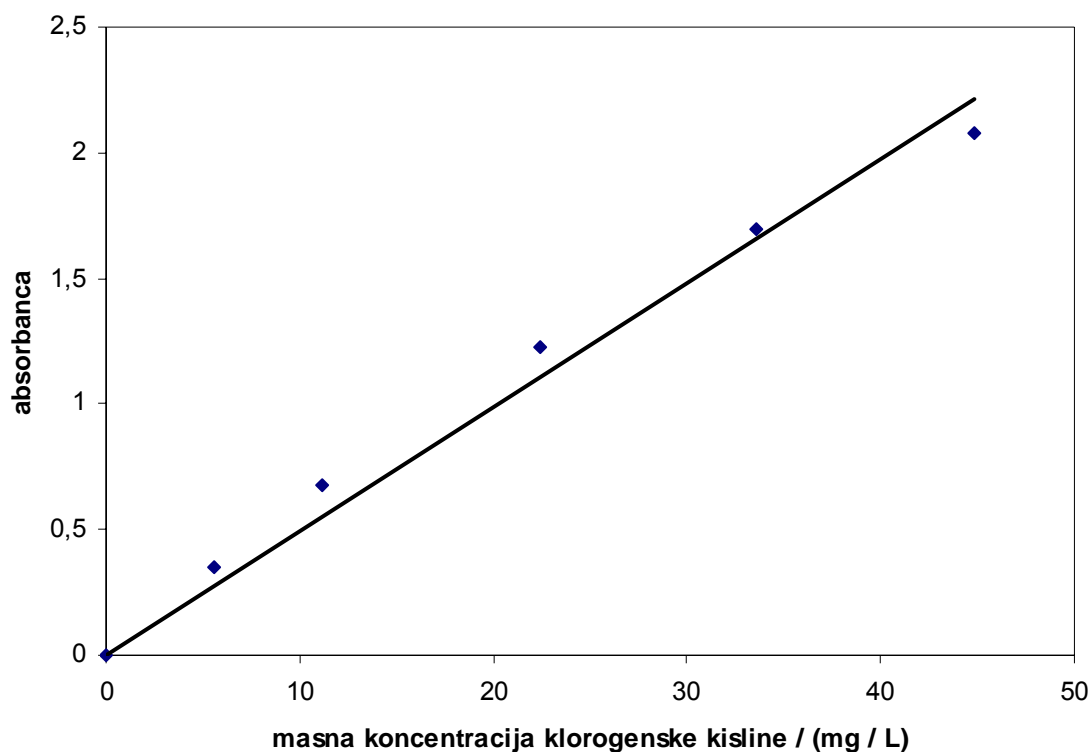
3.3.6.3 Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili klorogensko kislino. V bučko (25 mL) smo zatehtali 0,014 g kisline in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Koncentracija tako pripravljene izhodne raztopine je bila 560 mg / L. V epice smo dodali izbrane volumne (V) izhodne raztopine klorogenske kisline in po Folin-Ciocalteu metodi izmerili absorbanco, A pri 765 nm. Vsako določitev absorbance smo opravili v dveh ponovitvah. V Preglednici 6 so podane vrednosti za masno koncentracijo klorogenske kisline v epici, $\gamma_{k.k.}$ in vrednosti za izmerjeno absorbanco.

Preglednica 5: Vrednosti za masno koncentracijo klorogenske kisline v epici, $\gamma_{k.k.}$ in vrednosti za izmerjeno absorbanco, A

V / (mL)	V H ₂ O / (mL)	$\gamma_{k.k.}$ (mg / L)	A
0,01	0,74	5,6	0,352
0,02	0,73	11,2	0,677
0,04	0,71	22,4	1,225
0,06	0,69	33,6	1,697
0,08	0,67	44,8	2,080

Z linearno regresijsko analizo smo določili smerni koeficient premice (umeritvene krivulje), ki je prikazana na Sliki 5. Vrednost za smerni koeficient, k je $0,0493 \pm 0,002$ ($R = 0,996$).



Slika 5: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih olja navadnega rička

3.3.6.4 Izračun vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v epici, $\gamma_{k.k.}$ izračunamo iz zveze:

$$\gamma_{k.k.} = A / k \quad \dots(7)$$

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju, izraženo kot mg klorogenske kisline na kg olja (mg / kg) izračunamo v skladu z naslednjo relacijo:

$$\text{vsebnost skupnih fenolnih spojin} = \frac{20 \cdot \gamma_{k.k.}}{m_{vz}} \quad \dots(8)$$

m_{vz} ...masa vzorca (g)

3.3.7 Rancimat metoda

Indukcijske čase vzorcev smo določili z Rancimatom 679, po navodilih proizvajalca Metrohm (Metrohm Ltd., Herisau, Švica). Pogoji določanja so bili naslednji: 3 mL vzorca, 110 °C, pretok zraka 20 L / h. Vzorce smo analizirali v dveh paralelkah, indukcijski čas pa izrazili v urah.

3.3.8 Določanje vsebnosti tokoferolov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Vsebnost tokoferolov v vzorcih smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) po metodi ISO 9936 (1997). Analize vzorcev so bile izvedene na tekočinskem kromatografu Agilent HPLC 110 sistem, opremljenim z :

- binarno črpalko (BinPump G1312A),
- aktivno termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom Automatic Liquid Sampler ALS G1329A + AlsTherm G1330B),
- termostatiranim predelom za kolone (COLCOLM G1316A),
- analizno kolono: Phenomenex Luna 5 μ Silica(2), 250 x 4,60 mm
- fluorescenčnim detektorjem (FLD G1321A); valovna dolžina vzbujanja 290 nm, valovna dolžina emisije: 330 nm

Mobilna faza: heksan:izopropanol = 99,3:0,7. Pretok mobilne faze: 1mL / min.

Injekcijski volumen: 20 μ L.

Vzorce smo analizirali v paralelki, vsebnost tokoferolov pa izrazili v mg / kg.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ VZORCA

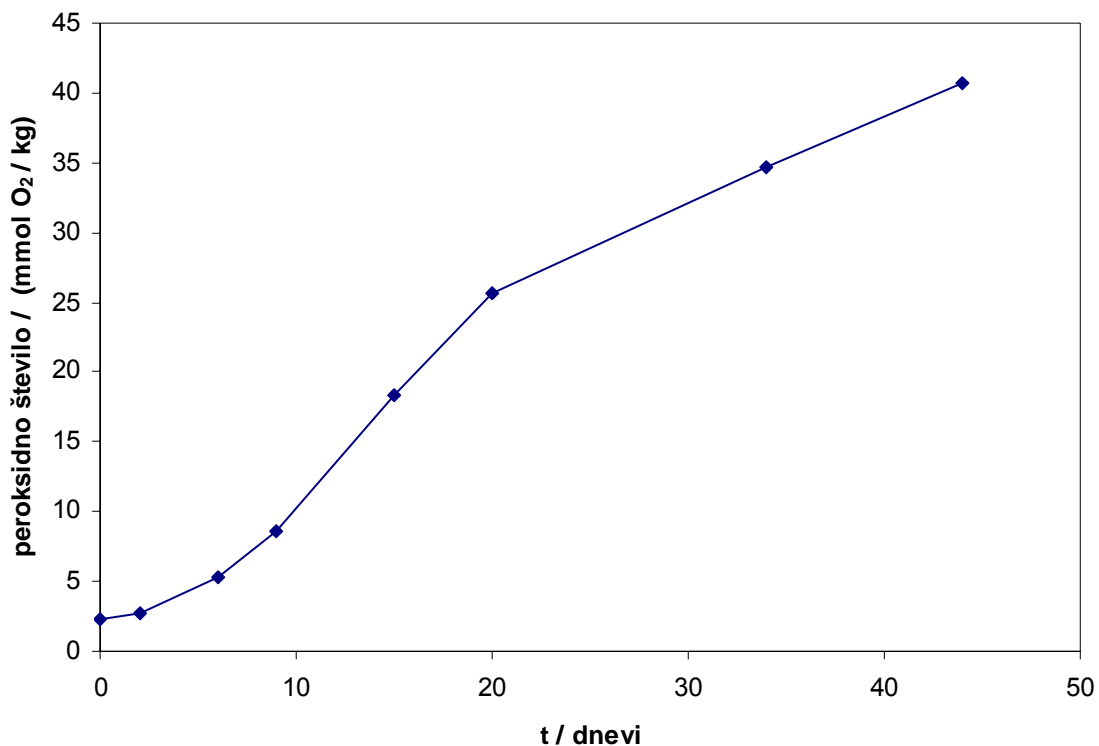
V Preglednici 6 so podane vrednosti saponifikacijskega števila, jodovega števila in kislinskega števila svežega olja navadnega rička. Podane so tudi vrednosti kislinskega števila po 9, 27 in 44 dneh skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C.

Preglednica 6: Vrednosti za saponifikacijsko, jodovo in kislinsko število olja navadnega rička

parameter	čas skladiščenja / dnevi	vrednost
saponifikacijsko število / (mg KOH / g olja)	0	178 ± 1
jodovo število / (g I ₂ / 100 g olja)	0	105 ± 1
kislinsko število / %	0	0,54 ± 0,01
	9	0,59 ± 0,01
	27	0,71 ± 0,01
	44	0,74 ± 0,01

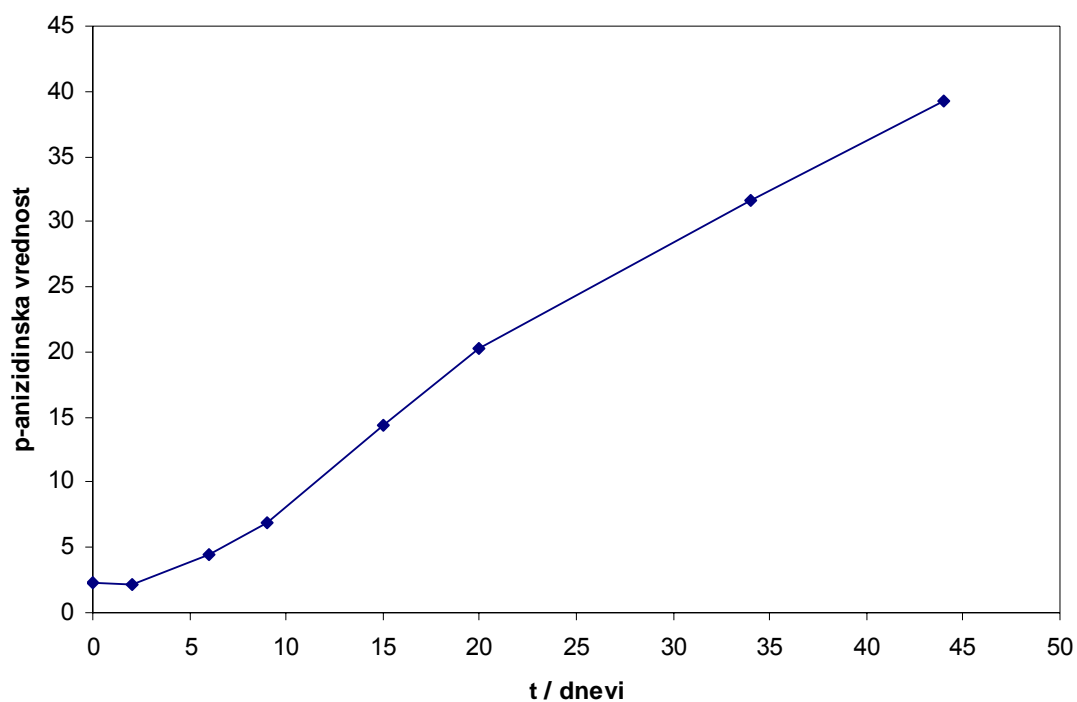
Vrednost za kislinsko število, izraženo kot odstotek oleinske kisline je znašalo v svežem olju navadnega rička 0,54 %. Kot je razvidno iz Preglednice 6, je vsebnost prostih maščobnih kislin s časom skladiščenja naraščala. Po 44 dneh skladiščenja je bila vsebnost prostih maščobnih kislin v olju 0,74 %. I₂

Vsebnost primarnih produktov oksidacije, izraženih kot peroksidno število v odvisnosti od časa skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C je podana v Preglednici 7. Slika 6 prikazuje odvisnost peroksidnega števila od časa skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C. Vrednost peroksidnega števila svežega olja je znašala 2,30 mmol O₂ / kg. Zatem je tvorba primarnih produktov oksidacije hitreje napredovala. Iz Slike 6 je razvidno, da je peroksidno število po 44 dneh skladiščenja naraslo do vrednosti 40,7 mmol O₂ / kg.



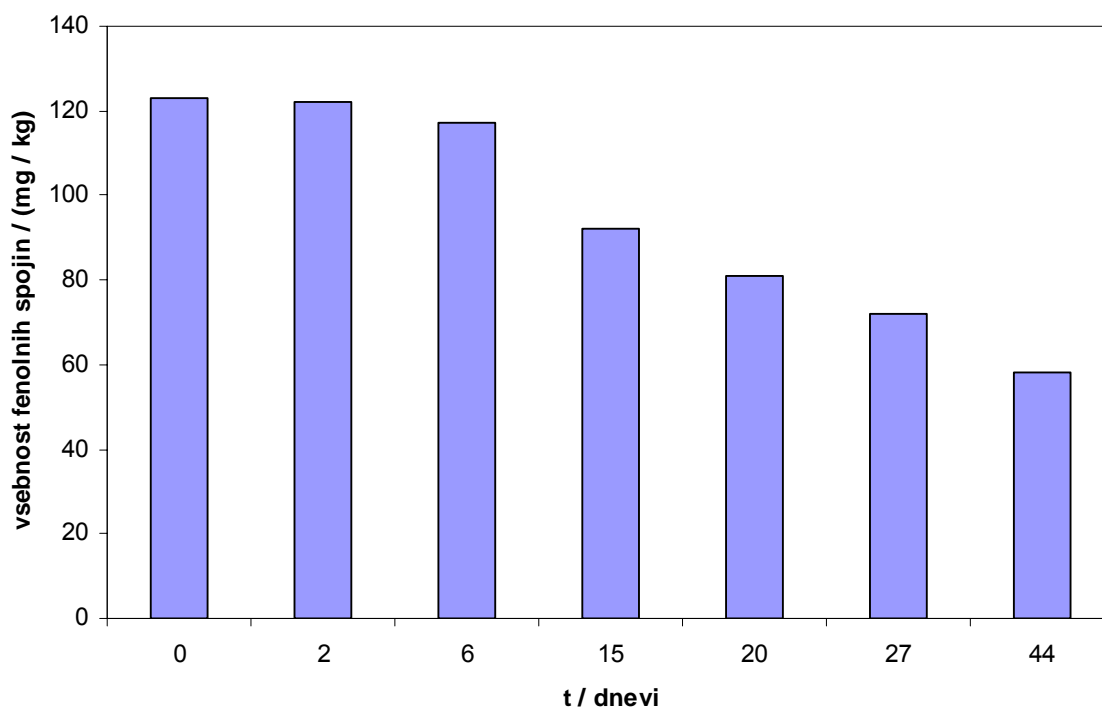
Slika 6: Odvisnost peroksidnega števila olja navadnega rička od časa skladiščenja (t) v temi pri temperaturi 50 °C

Nastanek sekundarnih produktov oksidacije smo spremljali z določitvijo *p*-anizidinske vrednosti (*p-AV*). *p-AV* je v svežem olju znašala 2,3. Preglednica 7 podaja *p-AV* v odvisnosti od časa skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C. Na Sliki 7, kjer je prikazana *p-AV* v odvisnosti od časa skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C, vidimo, da le ta s časom narašča. Po prvih dneh skladiščenja se *p-AV* signifikantno ni razlikovala od *p-AV* za sveže olje. Zatem je tvorba produktov oksidacije hitreje napredovala. Po 44 dneh skladiščenja je *p-AV* narasla do vrednosti 39.



Slika 7: Odvisnost *p*-anizidinske vrednosti olja navadnega rička od časa skladiščenja (t) v temi pri temperaturi 50 °C

V Preglednici 7 so podane vrednosti za vsebnost skupnih fenolnih spojin, v odvisnosti od časa skladiščenja pri temperaturi 50 °C. Iz Slike 8 je razvidno, da vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju navadnega rička pada s časom skladiščenja. V svežem ričkovem olju smo določili vsebnost skupnih fenolnih snovi 123 mg / kg. Po 44 dneh skladiščenja je bila vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju 58 mg / kg.



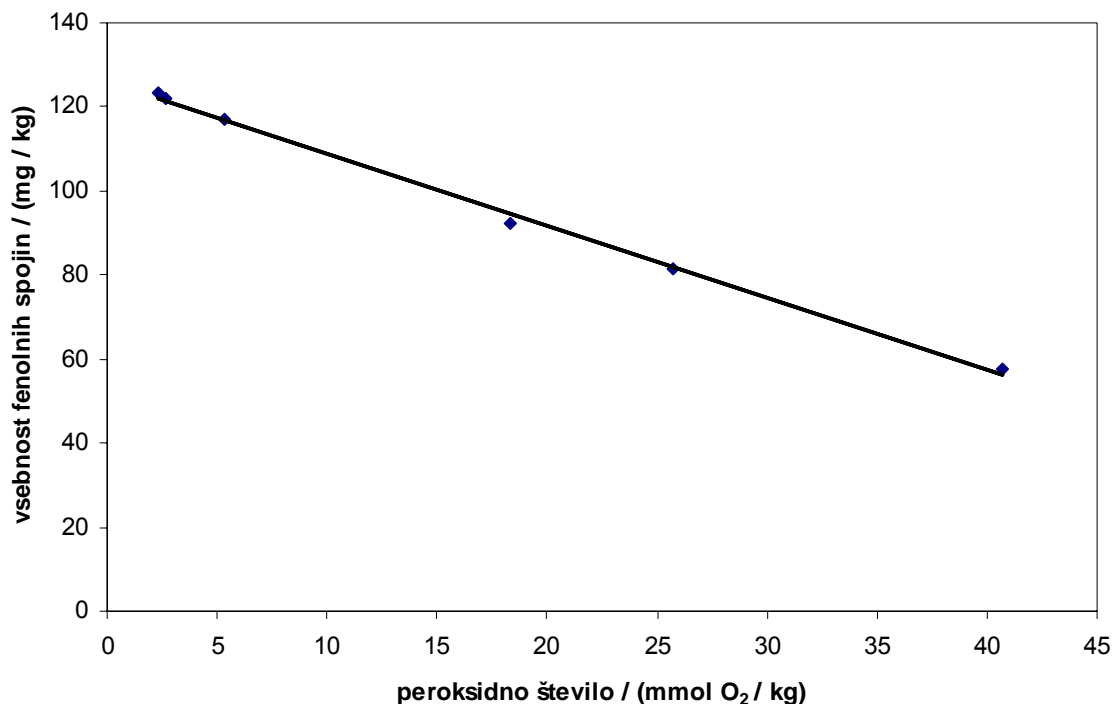
Slika 8: Vsebnosti skupnih skupnih fenolnih spojin v olju v odvisnosti od časa skladiščenja (t) v temi, pri temperaturi 50 °C

Preglednica 7: Vrednosti za peroksidno število, *p*-anizidinsko vrednost, vsebnost skupnih fenolnih spojin in skupnih tokoferolov v odvisnosti od časa skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C

čas skladiščenja / (dnevi)	peroksidno število / (mmol O ₂ / kg)	<i>p</i> -anizidinska vrednost	vsebnost skupnih fenolnih spojin / (mg / kg)	vsebnost skupnih tokoferolov / (mg / kg)
0	2,30 ± 0,01	2,3 ± 0,1	123,2 ± 0,2	750,8 ± 27,2
2	2,72 ± 0,02	2,2 ± 0,1	121,8 ± 0,6	nd
6	5,31 ± 0,03	4,5 ± 0,1	117,1 ± 0,5	nd
9	8,6 ± 0,2	6,9 ± 0,3	nd	nd
15	18,3 ± 0,5	14,4 ± 0,1	92,4 ± 0,5	439,3 ± 12,9
20	25,7 ± 0,2	20,3 ± 0,3	81,3 ± 0,4	nd
27	nd	nd	71,6 ± 0,5	291,0 ± 16,0
34	34,7 ± 0,5	31,6 ± 0,4	nd	nd
44	40,7 ± 0,2	39,0 ± 1,0	57,8 ± 0,1	nd

nd- ni določitve

Na Sliki 9 je pokazana vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju navadnega rička kot funkcija peroksidnega števila. Vidimo, da vsebnost skupnih fenolnih spojin pada z naraščajočim peroksidnim številom.



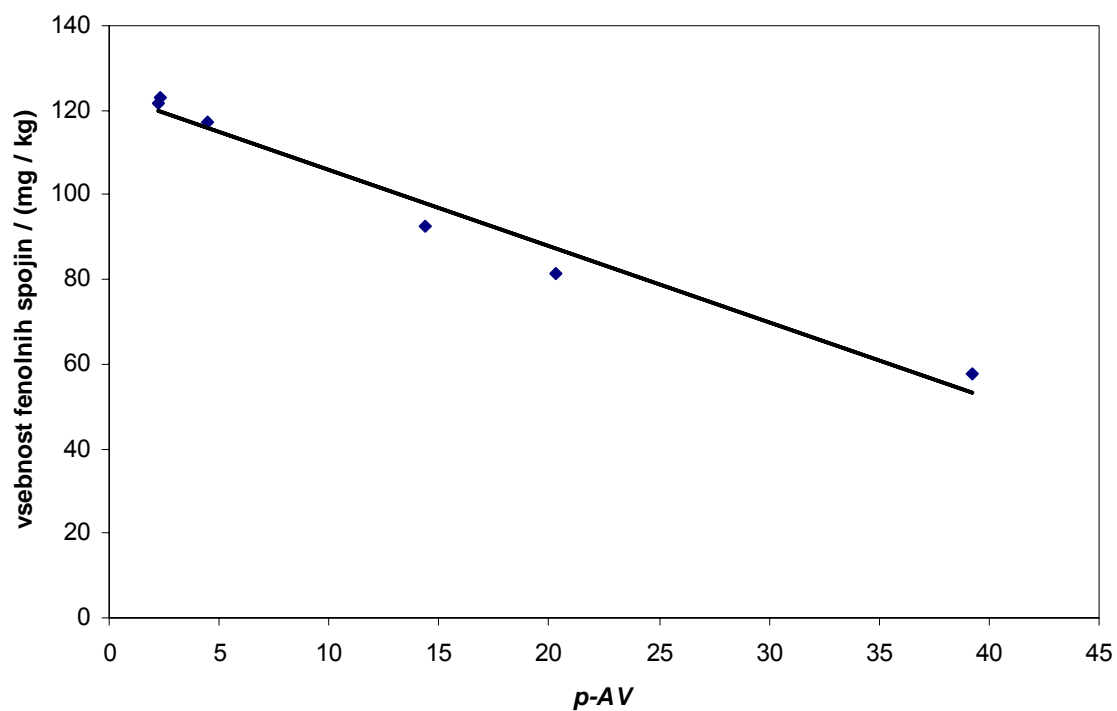
Slika 9: Vsebnost skupnih fenolnih spojin kot funkcija peroksidnega števila

Kako se spreminja vsebnost skupnih fenolnih spojin ob istočasnem naraščanju $P\check{S}$, smo opisali z linearno zvezo:

$$\text{Vsebnost skupnih fenolnih spojin} = a_0 + a_1 P\check{S} \quad \dots(9)$$

a_0 in a_1 sta regresijska parametra. Vrednosti a_0 , a_1 in korelacijski koeficient R , smo dobili z linearno regresijsko analizo. Omenjene vrednosti znašajo: $a_0 = 126 \pm 0,9$, $a_1 = -1,71 \pm 0,04$ in $R = -0,999$.

Na Sliki 10 je pokazana vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju navadnega rička kot funkcija $p-AV$.



Slika 10: Vsebnost skupnih fenolnih spojin kot funkcija $p-AV$

Na Sliki 10 vidimo, da vsebnost skupnih fenolnih spojin linearno pada z naraščajočo $p-AV$. ($R = -0,984$).

Vsebnosti tokoferolov v svežem olju, ki smo ga skladiščili 15 dni oz. 27 dni v temi pri temperaturi 50 °C so podane v Preglednici 8.

Preglednica 8: Vsebnost tokoferolov v olju navadnega rička v odvisnosti od časa skladiščenja pri temperaturi 50 °C

	OL 1	OL2	OL3
vsebnost α - tokoferola / (mg / kg)	40,8 ± 8,2	6,3 ± 1,9	< md
vsebnost β -tokoferola / (mg / kg)	< md	< md	< md
vsebnost γ -tokoferola / (mg / kg)	710 ± 19	433 ± 11	291 ± 16
vsebnost skupnih tokoferolov / (mg / kg)	750,8 ± 27,2	439,3 ± 12,9	291 ± 16

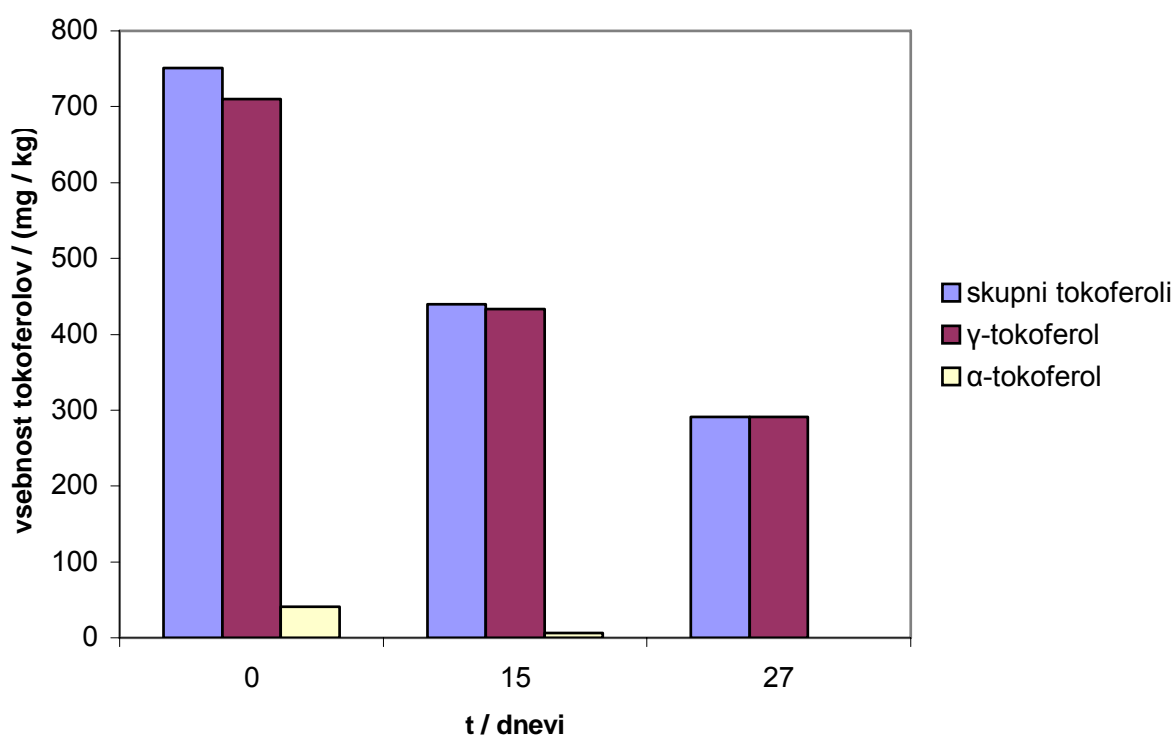
OL 1... sveže olje

OL 2... olje, skladiščeno pri temperaturi 50 °C 15 dni

OL 3... olje, skladiščeno pri temperaturi 50 °C 27 dni

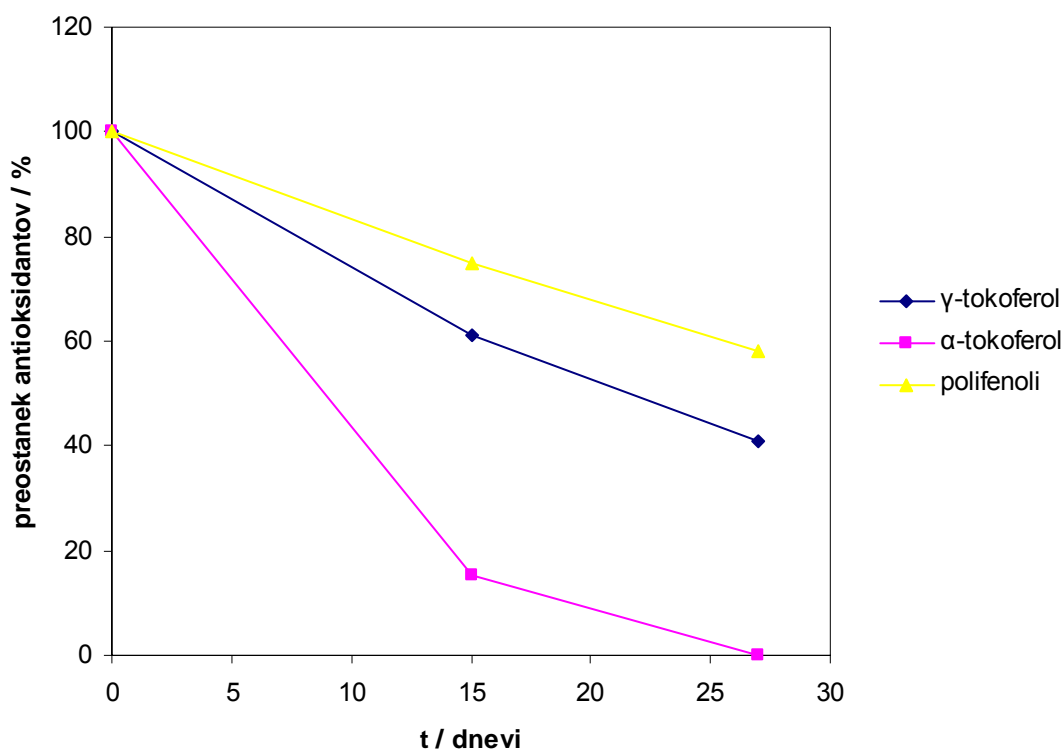
md..... meja detekcije

Vsebnost tokoferolov v olju, ki smo ga skladiščili v temi pri temperaturi 50 °C pada s časom skladiščenja, tako kot je prikazano na Sliki 11. V svežem olju navadnega rička smo določili vsebnost skupnih tokoferolov 751 mg / kg. Po 27 dneh skladiščenja je bila v olju vsebnost skupnih tokoferolov 291 mg / kg. Med tokoferoli, ki smo jih določili v svežem olju sta α -tokoferol (41 mg / kg) in γ -tokoferol (710 mg / kg). Vsebnost za β -tokoferol je bila pod mejo določljivosti.



Slika 11: Vsebnosti tokoferolov v olju navadnega rička v odvisnosti od časa skladiščenja (t) v temi pri temperaturi 50 °C

Na Sliki 12 je prikazan delež antioksidantov (fenolne spojine, α -tokoferol in γ -tokoferol), ki so preostali v olju po 15 in 27 dneh skladiščenja. Na Sliki 12 vidimo, da je po 15 dneh skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C v olju preostalo še 75 % začetne vsebnosti skupnih fenolnih spojin, 60 % začetne vsebnosti γ -tokoferola in manj kot 10 % α -tokoferola. Po 27 dneh skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C je v olju preostalo še 60 % začetne vsebnosti skupnih fenolnih spojin, 40 % začetne vsebnosti γ -tokoferola, medtem ko α -tokoferola po tem času v olju nismo več uspeli določiti.



Slika 12: Preostanek antioksidantov v olju navadnega rička v odvisnosti od časa skladiščenja (t) v temi pri temperaturi 50 °C

Preglednica 9 nam prikazuje indukcijske periode za olje barvilnega rumenika, določene z Rancimatom pri temperaturi 110 °C. Kot je razvidno iz Preglednice 9 je indukcijska perioda za vzorec olja barvilnega rumenika z dodanim ekstraktom fenolnih spojin (11 mg / kg) daljša (13,4 h), kot pri vzorcu brez dodatka (12,3 h).

Preglednica 9: Indukcijske periode vzorcev olja barvilnega rumenika brez in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin, določeni z Rancimatom pri temperaturi 110 °C

vzorec	indukcijski perioda / h
olje barvilnega rumenika	12,3 ± 0,3
olje barvilnega rumenika + ekstrakt fenolnih spojin	13,4 ± 0,5

V Preglednici 10 so podane vrednosti za *PŠ* olja barvilnega rumenika brez dodanega ekstrakta fenolnih spojin in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin (11 mg / kg), v odvisnosti od časa skladiščenja v temi, pri temperaturi 65 °C. Iz Preglednice 10 je razvidno, da je po 6 dneh skladiščenja *PŠ* olja, ki je vsebovalo ekstrakt fenolnih spojin $11,3 \pm 0,2$ mmol O₂ / kg. Omenjena vrednost se signifikantno loči od vrednosti za *PŠ* olja brez dodanega ekstrakta, ki znaša $14,0 \pm 0,1$ mmol O₂ / kg. Kot je videti v Preglednici 10, se po 12 dneh skladiščenja vrednosti za *PŠ* olja brez in z dodanim ekstraktom signifikantno ne razlikujeta.

Preglednica 10: Vrednosti peroksidnega števila olja barvilnega rumenika brez in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin v odvisnosti od časa skladiščenja v temi, pri temperaturi 65 °C

čas skladiščenja / dnevi	peroksidno število / (mmol O ₂ / kg)	
	olje barvilnega rumenika	olje barvilnega rumenika + ekstrakt fenolnih spojin
0	7,3 ± 0,2	7,2 ± 0,1
6	14,0 ± 0,1	11,3 ± 0,2
12	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,2

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo v svežem olju navadnega rička (*Camelina sativa*) določili vsebnost prostih maščobnih kislin, prisotnost primarnih in sekundarnih produktov oksidacije ter vsebnost skupnih fenolnih spojin in tokoferolov. Zatem smo zasledovali, kako se omenjeni parametri spreminjajo s časom skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C. Poleg tega smo dokazali tudi antioksidativno delovanje ekstrakta fenolnih spojin iz ričkovega olja.

Vsebnost prostih maščobnih kislin je eden izmed parametrov s katerim se vrednoti kakovost olj. Sveže ričkovo olje, ki smo ga uporabili v naši raziskavi je vsebovalo 0,54 % prostih maščobnih kislin, izraženih kot odstotek oleinske kisline. Glede na Pravilnik o jedilnih oljih, (2003) je omenjena vrednost sprejemljiva. Najvišja vrednost prostih maščobnih kislin v nerafiniranih oljih določena z omenjenim pravilnikom je 3,0 %. Prisotnost prostih maščobnih kislin v olju je posledica hidrolitskega delovanja lipolitičnih encimov med pripravo semen za proizvodnjo olja. Vsekakor je kislinsko število parameter, ki pokaže na to, kako se je obravnavalo semena pred in med stiskanjem olja. Med skladiščenjem olja v temi pri temperaturi 50 °C je vsebnost prostih maščobnih kislin rahlo narasla in po 44 dneh skladiščenja dosegla vrednost 0,74 %.

Vrednost peroksidnega števila v svežem ričkovem olju je znašala 2,30 mmol O₂ / kg. Glede na Pravilnik o jedilnih oljih je vrednost sprejemljiva. Najvišja dovoljena vrednost za peroksidno število nerafiniranega olja po Pravilniku o jedilnih oljih, (2003) je 10 mmol O₂ / kg.

Proces avtooksidacije v olju navadnega rička med 44 dnevnim skladiščenjem v temi pri temperaturi 50 °C smo spremljali tako, da smo periodično določali peroksidno število in *p*-anizidinsko vrednost. Stopnja iniciacije v procesu avtooksidacije ričkovega olja pri izbranih pogojih je trajala dva dni, saj je bila v tem obdobju vrednost *PŠ* v okviru eksperimentalne napake konstantna. V naslednjih dneh je bila tvorba primarnih produktov oksidacije bolj napredujoča, kar je značilno za stopnjo propagacije. V 44 dneh skladiščenja je peroksidno število naraslo do vrednosti 40,7 mmol O₂ / kg. Stopnja terminacije tj. stopnja ko se vrednost *PŠ* s časom skladiščenja ne spreminja več, v 44 dneh skladiščenja pri izbranih pogojih v olju navadnega rička ni bila dosežena.

Najvišja dovoljena vrednost za peroksidno število ($10 \text{ mmol O}_2 / \text{kg}$), ki jo določa Pravilnik o jedilnih oljih, (2003) je bila v olju dosežena po desetih dneh skladiščenja. Vemo, da je temperatura eden izmed pomembnejših dejavnikov, ki znatno vplivajo na hitrost oksidacije. Zato je zanimiva primerjava z rezultati raziskave, ki je bila opravljena na olju navadnega rička, ki so ga skladiščili na sobni temperaturi v temi (Abramovič in Abram, 2005). V tem primeru je bila omenjena najvišja dovoljena vrednost $P\check{S}$ dosežena šele po 6,5 mesecih skladiščenja.

Zanimiva je tudi primerjava z rezultati raziskave (Koski in sod., 2003), ki so jo opravili na ogrščičnem olju (*Brasica napus*), ki tako kot navadni riček pripada družini križnic. Pri temperaturi skladiščenja $60 \text{ }^\circ\text{C}$, ki je bila v primerjavi z našo višja za $10 \text{ }^\circ\text{C}$, je $P\check{S}$ doseglo vrednost $10 \text{ mmol O}_2 / \text{kg}$ v ogrščičnem olju po 12 dneh skladiščenja v temi. Kaže, da je ogrščično olje oksidativno stabilnejše od ričkovega olja, ki smo ga uporabili v naši raziskavi. Po 20 dneh skladiščenja pri omenjenih pogojih je $P\check{S}$ ogrščičnega olja naraslo na $21 \text{ mmol O}_2 / \text{kg}$. Ti izsledki kažejo, da je stopnja nenasičenosti eden izmed parametrov, ki znatno vplivajo na hitrost avtooksidacije. Ogrščično olje ima namreč visoko vsebnost (50 %) enkrat nenasičene oleinske kisline in v primerjavi z oljem navadnega rička znatno nižjo vsebnost α -linolenske kisline (10 %).

Omenili smo že, da na hitrost avtooksidacije olja vpliva tudi prisotnost naravno prisotnih spojin z antioksidativnim delovanjem. V olju oljne ogrščice v raziskavi Koskijeve in sod. (2003) je bila vsebnost tokoferolov podobna vsebnosti tokoferolov v olju navadnega rička v naši raziskavi (Preglednica 8). Vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju oljne repice, ($1066 \text{ mg} / \text{kg}$) pa je znatno preseгла vsebnost fenolnih spojin, ki smo jo določili v olju navadnega rička v okviru naše raziskave (Preglednica 7).

p-anizidinska vrednost se v olju navadnega rička v prvih dveh dneh skladiščenja ni povečala. Ker je omenjena vrednost merilo za nastanek aldehydov in sekundarnih produktov oksidacije, lahko sklepamo, da se ti produkti v prvih dneh skladiščenja niso tvorili. V naslednjih dneh skladiščenja pri izbranih pogojih je bila tvorba sekundarnih produktov oksidacije bolj napredujoča. Po 44 dneh skladiščenja je *p-AV* dosegla vrednost 39.

Del raziskave je bil namenjen določitvi vsebnosti skupnih fenolnih spojin (izraženo kot klorogenska kislina) v ričkovem olju, ki smo jih iz olja ekstrahirali z 80 % metanolom in določili s Folin-Ciocalteu metodo. V svežem ričkovem olju smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin $123 \text{ mg} / \text{kg}$. V primerjavi z olji, ki so bogata s fenolnimi spojinami, npr. oljčno ali repično oz. ogrščično olje, je vsebnost fenolnih spojin v ričkovem olju sicer nižja, vendar ne zanemarljiva. Omenili smo že visoko vsebnost skupnih fenolnih spojin v

olju oljne ogrščice (1066 mg / kg), ki jo je določila Koskijeva in sod. (2003). Poudariti je treba, da so v omenjeni raziskavi opravili ekstrakcijo olja s stiskanjem semen oljne ogrščice pri temperaturi okoli 100 °C in zvišanem tlaku. Pri takšnih pogojih se namreč pri ekstrakciji olja, v primerjavi s hladno stiskanim oljem, iz semen izloči tudi večja količina fenolnih spojin.

V okviru diplomskega dela smo ugotavljali, kako se vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju navadnega rička spreminja s časom skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C. Ugotovili smo, da koncentracija skupnih fenolnih spojin v olju s časom skladiščenja pada. Fenolne spojine med skladiščenjem olja v katerem potekajo procesi avtooksidacije vstopajo v reakcije s prostimi radikali (Slika 4), pri čemer izgubijo svojo antioksidativno učinkovitost. Ugotavljajo, da so v procesu avtooksidacije med skladiščenjem oljčnega olja posamezne fenolne spojine bolj in druge manj stabilne (Morello in sod., 2004; Hrcirik in sod., 2005).

Upoštevač vrednosti regresijskih parametrov a_0 in a_1 v relaciji (9) smo izračunali, da je pri $P\check{S} = 10$ mmol O_2 / kg (najvišja dovoljena vrednost za peroksidno število po Pravilniku o jedilnih oljih) v ričkovem olju vsebnost skupnih fenolnih spojin znašala 109 mg / kg. Ta vrednost predstavlja 89 % začetne vrednosti skupnih fenolnih spojin. Po 44 dneh skladiščenja je v olju preostalo še 47 % začetne vrednosti skupnih fenolnih spojin.

Znižanje koncentracije fenolnih spojin in istočasno zvišanje $P\check{S}$ v olju, ki so ga skladiščili 9 mesecev pri temi pri temperaturi 20 °C je določil tudi Tsimodou s sodelavci (2004). V raziskavi, ki so jo opravili na deviškem oljčnem olju (Okogeri in Tansioula-Margari, 2002), so ugotovili, da se je v olju po 12 mesečnem skladiščenju v temi pri temperaturi med 6 °C in 15 °C koncentracija skupnih fenolnih spojin znižala za skoraj 50 %. V istem obdobju je vrednost za $P\check{S}$ olja narasla od 3,6 mmol O_2 / kg na vrednost 13 mmol O_2 / kg.

Rezultati naše raziskave kažejo visoko korelacijo med $P\check{S}$ olja navadnega rička in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ($R = -0,999$). Deiana in sodelavci (2002) so med 7 mesečnim skladiščenjem oljčnega olja pri sobni temperaturi spremljali soodvisnost med $P\check{S}$ in fenolnimi spojinami v olju v primerjavi z našimi rezultati določili slabšo korelacijo med omenjenima spremenljivkama ($R = -0,791$).

Del raziskave je bil namenjen določitvi vsebnosti tokoferolov v olju navadnega rička. V svežem olju je bila vsebnost skupnih tokoferolov 751 mg / kg. Med tokoferoli, ki smo jih določili v svežem olju je bil najbolj zastopan γ -tokoferol (710 mg / kg). Poleg γ -tokoferola smo v svežem olju določili še prisotnost α -tokoferola (41 mg / kg). Vsebnosti β -tokoferola in δ -tokoferola v olju navadnega rička nismo določili. Omenjeni izsledki so v skladu z

rezultati raziskave Zubra in Matthäusa (2002), (skupni tokoferoli: 695 mg / kg – 994 mg / kg; γ -tokoferol: 651 mg / kg – 922 mg / kg; α -tokoferol: 14 mg / kg – 46 mg / kg). β -tokoferola v ričkovem olju, prav tako kot mi, niso določili. Zanimivo je, da so v raziskavi Zubra in Matthäusa (2002) določili tudi prisotnost δ -tokoferola. Rezultati naše raziskave kažejo, da omenjenega homologa v ričkovem olju ni.

S stališča oksidativne stabilnosti olja je visoka vsebnost γ -tokoferola ugodna. V primerjavi z α -tokoferolom ima γ -tokoferol znatno večjo antioksidativno učinkovitost. Le ta je posledica večje stabilnosti γ -tokoferola in različnih reakcijskih produktov, ki se tvorijo v reakcijah z lipidnimi radikali (Slika 3). S stališča biološke vrednosti olja pa je to razmerje manj ugodno, saj je znano, da je biološko najbolj učinkovit α -tokoferol.

V okviru diplomskega dela smo ugotavljali, kako skladiščenje olja pri temperaturi 50 °C vpliva na vsebnost tokoferolov. Med skladiščenjem vsebnost tokoferolov v olju pada. Po 15 dneh skladiščenja je bila vsebnost tokoferolov v olju 439 mg / kg, v naslednjih 12 dneh je padla vsebnost skupnih tokoferolov v olju na vrednost 291 mg / kg. Po 27 dneh skladiščenja ričkovo olje α -tokoferola ne vsebuje več. To je razumljivo, če upoštevamo dejstvo, da v reakcijah, ki so opisane na Sliki 3, reagira α -tokoferol v primerjavi z ostalimi tokoferoli najhitreje (Belitz in Grosch, 1999). Kot je bilo pričakovati, je γ -tokoferol pokazal večjo stabilnost, saj ga je olje po 27 dneh skladiščenja vsebovalo še 291 mg / kg, kar predstavlja 40 % vsebnosti v svežem olju.

V svoji raziskavi sta Okogeri in Tasioula-Margari (2002) v oljčnem olju med skladiščenjem v temi pri temperaturi med 6 °C in 15 °C spremljala vsebnost tokoferolov. Po 12 mesecih skladiščenja pri omenjenih pogojih je v olju preostalo 40 % začetne vrednosti tokoferolov. Vsebnost tokoferolov v oljčnem olju med skladiščenjem so spremljali v svoji raziskavi Morello in sod. (2004). Ugotovili so, da olje, ki je na začetku vsebovalo 200 mg / kg α -tokoferola, po 12 mesecih skladiščenja v temi pri sobni temperaturi omenjene spojine ne vsebuje več.

V okviru diplomskega dela smo preverjali tudi antioksidativno delovanje fenolnih spojin, ki smo jih ekstrahirali iz ričkovega olja. Zaščitni učinek ekstrahiranih fenolnih spojin na oksidativno stabilnost lipidnega sistema smo dokazali z Rancimat metodo. V tem primeru smo določili, da dodatek ekstrakta fenolnih spojin (11 mg / kg) podaljša indukcijsko periodo olja barvilnega rumenika za skoraj 10 %.

Antioksidativno učinkovitost smo potrdili tudi tako, da smo olje barvilnega rumenika brez dodatka in z dodanim ekstraktom fenolnih spojin skladiščili v temi pri temperaturi 65 °C. Ugotovili smo, da je prisotnost fenolnih spojin v olju barvilnega rumenika v koncentraciji

11 mg / kg v prvih 6 dneh skladiščenja upočasnila proces avtooksidacije nenasičenih maščobnih kislin in s tem nastanek primarnih produktov avtooksidacije, saj se *PŠ* olja, ki je vsebovalo ekstrakt fenolnih spojin signifikantno loči od *PŠ* olja brez dodanega ekstrakta. V naslednjih dneh so se fenolne spojine med skladiščenjem najverjetneje oksidirale in s tem izgubile svoj antioksidativni učinek. Vrednosti za *PŠ* olja brez in z dodanim ekstraktom se namreč po 12 dneh skladiščenja, ko je bila narejena analiza, signifikantno nista razlikovali.

V okviru določanja antioksidativne učinkovitosti smo uporabili celotno fenolno frakcijo ki smo jo ekstrahirali 80 % metanolom iz ričkovega olja. V tej frakciji so najverjetneje prisotne različne zvrsti fenolnih spojin. Posamezne fenolne spojine imajo različno antioksidativno učinkovitost (Kikuzaki in sod., 2002; Pekkarinen in sod., 1999). Med seboj lahko delujejo tudi sinergistično (Baldioli in sod., 1996), medtem ko drugi poročajo o učinkovanju po načelu aditivnosti (Mateos, 2003). Nekatere pa lahko učinkujejo celo prooksidativno (Škrget in sod., 2005).

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov raziskave zaključujemo naslednje:

- ✓ glede na vrednost peroksidnega števila in vsebnost prostih maščobnih kislin, olje navadnega rička ustreza pogojem Pravilnika o jedilnih oljih (2003);
- ✓ olje navadnega rička vsebuje fenolne spojine, katerih vsebnost je nižja kot pri oljčnem in repičnem olju, vendar ne zanemarljiva;
- ✓ rezultati kažejo visoko korelacijo med *PŠ* olja navadnega rička in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin;
- ✓ olje navadnega rička ima visoko vsebnost γ -tokoferola, vsebnost α -tokoferola je nizka, β - in δ - tokoferola nismo določili;
- ✓ čas in pogoji skladiščenja vplivajo na zmanjšanje vsebnosti tokoferolov in fenolnih spojin;
- ✓ ekstrahirane fenolne spojine iz olja navadnega rička so pokazale antioksidativno učinkovitost v lipidnem mediju.

Z raziskovalnim delom smo potrdili vse delovne hipoteze.

6 POVZETEK

V diplomskem delu smo v svežem olju navadnega rička določili vsebnost prostih maščobnih kislin, prisotnost primarnih in sekundarnih produktov oksidacije ter vsebnost fenolnih spojin in tokoferolov. Pokazali smo tudi kako se omenjeni parametri spreminjajo s časom skladiščenja olja v temi pri temperaturi 50 °C ter iz olja navadnega rička ekstrahirali fenolne spojine in dokazali njihov antioksidativni učinek v lipidnem sistemu.

Glede na vrednost peroksidnega števila (2,30 mmol O₂ / kg) in vsebnost prostih maščobnih kislin (0,54 %) sveže olje navadnega rička ustreza pogojem Pravilnika o jedilnih oljih (2003). V 44 dneh skladiščenja v temi pri temperaturi 50 °C je peroksidno število po dvodnevni stopnji iniciacije naraslo do vrednosti 40,7 mmol O₂ / kg. Najvišja dovoljena vrednost za peroksidno število, določena s Pravilnikom, je bila v olju navadnega rička dosežena po desetih dneh skladiščenja. V 44 dneh skladiščenja je *p*-anizidinsko število naraslo od začetne vrednosti 2,3 do vrednosti 39. V svežem ričkovem olju je vsebnost skupnih fenolnih spojin 123 mg / kg. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v olju navadnega rička pade med 44 dnevnih skladiščenjem olja na vrednost 58 mg / kg. Med peroksidnim številom in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin med skladiščenjem olja navadnega rička obstaja linearna zveza ($R = -0,999$). V svežem ričkovem olju je vsebnost skupnih tokoferolov 750 mg / kg. Med 27 dnevnim skladiščenjem olja vsebnost skupnih tokoferolov v olju pade na vrednost 291 mg / kg. Med tokoferoli, ki so prisotni v svežem olju navadnega rička sta γ -tokoferol (710 mg / kg) in α -tokoferol (41 mg / kg). γ -tokoferol je v primerjavi z α -tokoferolom bolj oksidativno stabilen. Po 27 dneh skladiščenja je v olju preostalo še 40 % začetne vsebnosti γ -tokoferola. Po 27 dneh skladiščenja ričkovo olje α -tokoferola ne vsebuje več. Dodatek fenolnih spojin (11 mg / kg) olju barvilnega rumenika ekstrahiranih iz olja navadnega rička podaljša indukcijsko periodo za skoraj 10 %. Po 6 dneh skladiščenja v temi pri temperaturi 65 °C se peroksidno število olja barvilnega rumenika, ki je vsebovalo ekstrakt fenolnih spojin (11 mg / kg) signifikantno loči od PŠ olja brez dodanega ekstrakta.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abramovič H., Abram V. 2005. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 63-70
- Angerosa F., d'Alessandro N., Konstantinou P., Di Giacinto L. 1995. GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43: 1802-1807
- AOAC Official method 993.20 Iodine value of fats and oils 1999. V: Official methods of analysis of AOAC international. Cunniff P. (ed.). Vol. 2. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, chapter 41: 7-9
- AOAC Official method 965.33 Peroxide value of oils and fats 1999. V: Official methods of analysis of AOAC international. Cunniff P. (ed.). Vol. 2. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, chapter 41: 9B-9B
- AOAC Official method 920.160 Saponification number 1999. V: Official methods of analysis of AOAC international. Cunniff P. (ed.). Vol. 2. 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, chapter 41: 9B-10
- Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro G.F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 1589-1593
- Belitz H.D., Grosch W. 1999. *Food chemistry*. 2nd ed. Berlin, Springer: 152-234
- Budin J.T., Breene W.M., Putnam D.H. 1995. Some compositional properties of *Camelina* (*Camelina sativa* L.Crantz) seeds and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72: 309-315
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2000. Tokoferoli in polifenoli v oljčnih oljih slovenske Istre. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-91

- Cert A., Moreda W., Perez-Camino M. C. 2000. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 881: 131-148
- Deiana M., Rosa A., Cao C.F., Pirisi F.M., Bandino G., Dessi M.A. 2002. Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: Importance of α -tocopherol concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4342-4346
- Eidhin D.Ní, Burke J., O'Beirne D. 2003. Oxidative stability of ω 3-rich camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread. *Journal of Food Science*, 68, 1: 345-353
- Eitenmiller R. R. 1997. Vitamin E content of fats and oils- nutritional implications. *Food Technology*, 51: 78-81
- Frankel E.N. 1984. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61: 1908-1917
- Frankel E.N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57: 51-55
- Goodwin T. W., Mercer E.I. 1983. Plant phenolics. Oxford, Oxford Academic Press: 528-566
- Gunstone F.D. 1984. Reaction of oxygen and unsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61: 441-453
- Gunstone F. D. 1994. *The lipid handbook*. London, Chapman and Hall: 131-132
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58: 996-968
- Hlastan Ribič C. 2002. Esencialne maščobne kisline. V: *Maščobe v prehrani*. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za higieno: 19-25
- Hrcirik K., Fritsche S. 2005. Relation between the endogenous antioxidant system and the quality of extra virgin olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2103-2110

- ISO 9936. Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherols and tocotrienols contents – Method using high-performance liquid chromatography. 1st ed. 1997: 11 str.
- ISO 660. Animal and vegetable fats and oils – Determination of acid value and acidity. 2nd ed. 1996: 8 str.
- Kikuzaki H., Nakatani N. 1989. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oregano vulgare* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 519-524
- Koski A., Pekkarinen S., Hopia A., Wähälä K., Heinonen M. 2003. Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food and Research Technology*, 217: 110-114
- Läubli M.W., Bruttel P.A., Schalch E. 1988. A modern method of determining the oxidative stability of fats and oils. *Food Marketing & Technology*, March: 16-18
- Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. 1995. *Food antioxidants*. New York, Marcel Dekker, Inc.: 480-490
- Mateos R., Dominguez M.M., Espartero Luis J., Cert A. 2003. Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7170-7175
- Matthäus B.W. 1996. Determination of oxidative stability of vegetable oils by rancimat and conductivity and chemiluminescence measurements. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 8: 1039-1043
- Mlakar Grobelnik S., Jakop M., Bavec F. 2003. Navadni riček (*Camelina sativa* (L.) Crantz). *Sodobno kmetijstvo*, 36, 11/12: 28-30
- Monteleone E., Caporale G., Carlucci A., Pagliarini E. 1998. Optimisation of extra virgin olive oil quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 31-37
- Morelló J.R., Motilva M.J., Tovar M.J., Romero M.P. 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphases on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85: 357-364

- Nawar W. W. 1996. Chemistry. V: Bailey's industrial oil and fats products. 5th ed. Vol. 1. Edible oil and fat products: general applications. Hui Y. H. (ed.). New York, John Wiley & Sons, Inc.: 397-423
- Okogeri O., Tasioula-Margari M. 2002. Changes occurring in phenolic compounds and α -tocopherol of virgin olive oil during storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1077-1080
- Paquot C., Hautfenne A. 1987. Determination of the *p*-anisidine value (*p*-A.V.). V: Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 7th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, IUPAC: 210-210
- Pekkarinen S.S., Heinonen I.M., Hopia I.A. 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 499-506
- Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj, jedilnih rastlinskih masteh in majonezi. 2003. Uradni list Republike Slovenije, 13, 122: 16814-16818
- Pravilnik o eruka kislini. 2003. Uradni list Republike Slovenije, 20: 2373-2387
- Raper N.R., Cronin F.J., Exler J. 1992. Omega-3 fatty acid content of the US food supply. Journal of the American College of Nutrition, 11: 304-308
- Rode J. 2000. Živilo prihodnosti: navadni riček (*Camelina sativa*) (L.) Crantz). Herbika, 1, 11/12: 30-32
- Rode J. 2001. Tradicionalno domače zdravilo: navadni riček - *Camelina sativa* (L.) Crantz. Herbika, 2, 2: 40-42
- Shahidi F., Naczk M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, Basel, Technomic Publishing Company: 235-273
- Simopoulos A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. American Journal of Clinical Nutrition, 70: 560-569
- Steinmetz K.A., Potter J.D. 1996. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. Journal of American Dietary Association, 96: 1027-1039

- Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rižner A., Simonič M., Knez Ž. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191-198
- Tsimidou M.Z., Georgiu A., Koidis A., Boskou D. 2004. Loss of stability of 'veiled' (cloudy) virgin oils in storage. *Food Chemistry*, 93, 3: 377-383
- Vuorela S., Meyer S.A., Heinonen M. 2003. Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hidrolysis and HPLC. *European Food and Research Technology*, 217: 517-523
- White P.J. 2000. Fatty acids in oilseeds (vegetable oils). V: *Fatty acids in foods and their health implicatinos*. 2nd ed. Chow C.K. (ed.). New York, Mercel Dekker, Inc.: 209-237
- Zubr J., Matthäus B. 2002. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*, 15: 155-162
- Zubr J. 1997. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Industrial Crops and Products*, 6: 113-119
- Zubr J. 2003. Dietary fatty acids and amino acids of *Camelina sativa* seed. *Journal of Food Quality*, 26: 451-462

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 recenzentu doc. dr. Rajku Vidrihu za pregled naloge.

Zahvaljujem se mag. Sergeji Vidakovič in zaposlenim v Emoni razvojnem centru za prehrano d.o.o v Ljubljani, ki so nam omogočili določanje stabilnosti olja z aparatom Rancimat.

Zahvaljujem se tehnični sodelavki ge. Jani Martinuč za pomoč v laboratoriju.

Zahvaljujem se osebju iz laboratorija Labs d.o.o v Izoli, ki so nam omogočili določitev vsebnosti tokoferolov v vzorcih.