

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Rozalija POVŠE

**DOLOČANJE STEROLNE SESTAVE OLJA
NAVADNEGA RIČKA (*Camelina sativa* (L.) Crantz)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Rozalija POVŠE

**DOLOČANJE STEROLNE SESTAVE OLJA NAVADNEGA RIČKA
(*Camelina sativa* (L.) Crantz)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**DETERMINATION OF STEROL COMPOSITION OF CAMELINA
OIL (*Camelina sativa* (L.) Crantz)**

M. Sc. Thesis
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Živilstvo. Opravljeno je bilo na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Janeza Hribarja, za somentorja doc. dr. Iztoka Jožeta Koširja in za recenzentko prof. dr. Heleno Abramovič.

Komisija za oceno in predstavitev:

Mentor: prof. dr. Janez Hribar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentor: doc. dr. Iztok Jože Košir
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Recenzentka: prof. dr. Helena Abramovič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rozalija Povše

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK UDK 664.34 + 633.85 : 543.635.3 (043) = 163.6

KG ričkovno olje/*Camelina sativa* (L.) *Crantz*/steroli/določanje sterolov/plinska kromatografija/ekstrakcija na trdnem nosilcu/validacija metod

AV POVŠE, Rozalija

SA HRIBAR, Janez (mentor)/KOŠIR, Iztok Jože (somentor)/ ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)

KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2012

IN DOLOČANJE STEROLNE SESTAVE OLJA NAVADNEGA RIČKA (*Camelina sativa* (L.) *Crantz*)

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)

OP XII, 85 str., 57 pregl., 17 sl., 47 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Sterole v ričkovem olju (*Camelina sativa* (L.) *Crantz*) smo določali s plinsko kromatografijo (GC), vzorec smo pred tem pripravili najprej z umiljenjem in nato z ekstrakcijo na trdnem nosilcu. Metodo smo validirali in iz rezultatov ugotovili, da je izbrana metoda specifična in selektivna ter ponovljiva in obnovljiva (z relativnim standardnim odklonom pri brasikasterolu 4,9 %, pri kampesterolu 6,6 %, pri β -sitosterolu 6,9 % in pri stigmasterolu 42,5 %). Rezultati validacije kažejo, da so vrednosti standardnega dodatka (recovery) med 85,72 % in 98,11 %. Metoda je linearna za betulin (interni standard) v območju 0,058–0,220 g/L, za brasikasterol v območju 0,00154–0,15 g/L, za kampesterol v območju 0,00544–0,6 g/L, za stigmasterol v območju 0,00307–0,3 g/L in za β -sitosterol v območju 0,0082–0,8 g/L, s povprečnim korelacijskim koeficientom več kot 0,99 pri vseh določenih sterolih. Zatem smo na vzorcih ričkovega olja slovenskega porekla (treh zaporednih let) kvantitativno določili vsebnost brasikasterola (2,3 mg/100 g), kampesterola (16,5 mg/100 g), stigmasterola (0,6 mg/100 g) in β -sitosterola (45,2 mg/100 g). Iz rezultatov sledi, da med letniki ni significantnih razlik, prav tako ni razlik v vremenskih razmerah v treh letih in zato sklepamo, da iz rezultatov ni mogoče določiti, ali vremenske razmere vplivajo na količino sterolov v olju. Primerjali smo tudi Slovenske vzorce s Finskimi (brasikasterol (2,4 mg/100 g), kampesterol (15,2 mg/100 g), stigmasterol (0,5 mg/100g) in β -sitosterol (43,5 mg/100 g)), z Avstrijskimi (brasikasterol (2,0 mg/100 g), kampesterol (12,3 mg/100 g), stigmasterol (0,5 mg/100 g) in β -sitosterola (33,4 mg/100g)), Nemškimi (brasikasterol (2,6 mg/100 g), kampesterol (12,3 mg/100 g), stigmasterol (0,9 mg/100 g) in β -sitosterola (47,1 mg/100 g)) in z vzorci Združenih držav Amerike (brasikasterol (2,1 mg/100 g), kampesterol (15,2 mg/100 g), stigmasterol (2,1 mg/100 g) in β -sitosterola (38,9 mg/100 g)) ter ugotovili, da med vzorci prav tako ni bilo significantnih razlik.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 664.34 + 633.85 : 543.635.3 (043) = 163.6

CX *Camelina* oil/*Camelina sativa* (L.) *Crantz*/sterols/determination of sterol composition/gas chromatography/solid phase extraction/validation of methods

AU POVŠE, Rozalija

AA HRIBAR, Janez (supervisor)/KOŠIR, Iztok Jože (co-advisor)/ ABRAMOVIČ
Helena (reviewer)

PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2012

TI DETERMINATION OF STEROL COMPOSITION OF CAMELINA OIL
(*Camelina sativa* (L.) *Crantz*)

DT M.Sc.Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

NO XII, 85 p., 57 tab., 17 fig., 47 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Sterols in *Camelina* oil were determined by gas chromatography, the sample was previously prepared by the saponification first and then with solid phase extraction. The method was validated and the results show that the chosen method is specific and selective, repeatable and reproducible (with standard deviation of 4,9 % brassicasterol; campesterol at 6,6 %; the β -sitosterol 6,9 % and stigmaterol 42,5 %). Results of validation show that the recovery is between 85,72 % and 98,11 %. Method is linear for betulin (internal standard) in quantity 0,058-0,220 g/L; for brassicasterol in 0,00154-0,15 g/L, for campesterol in 0,00544-0,6 g/L; for stigmaterol 0,00307-0,3 g/L and for β -sitosterol in 0,0082-0,8 g/L, with an average correlation coefficient of more than 0,99 with all certain sterols. Then we have quantitatively assessed contents of brassicasterol (2,3 mg/100 g), campesterol (16,5 mg/100 g), stigmaterol (0,6 mg/100 g) and β -sitosterol (45,2 mg/100 g) in *Camelina* oil samples of Slovenian origin (three consecutive years). In the results, the samples did not show significant differences between different years and there was no difference in weather conditions over three years, which is why we conclude that it is not possible to determine from results, whether the weather conditions affect the amount of sterols in the oil. We also compared Slovenian samples with those from Finland (brassicasterol (2,4 mg/100 g), campesterol (15,2 mg/100 g), stigmaterol (0,5 mg/100 g) and β -sitosterol (43,5 mg/100 g), Austria (brassicasterol (2,0 mg/100 g), campesterol (12,3 mg/100 g), stigmaterol (0,5 mg/100 g) and β -sitosterol (33,4 mg/100 g), Germany (brassicasterol (2,6 mg/100 g), campesterol (12,3 mg/100 g), stigmaterol (0,9 mg/100 g) and β -sitosterol (47,1 mg/100 g) and the patterns of the United States of America (brassicasterol (2,1 mg/100 g), campesterol (15,2 mg/100 g), stigmaterol (2,1 mg/100 g) and β -sitosterol (38,9 mg/100 g) and found that there were also no differences between the samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI

1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 NAVADNI RIČEK ALI <i>Camelina sativa</i> (L.) <i>Crantz</i>	2
2.1.1 Morfologija.....	2
2.1.2 Pridelava in predelava navadnega rička	4
2.2 RIČKOVO OLJE	4
2.2.1 Oljna pogača	6
2.2.2 Uporaba in izkoriščanje olja navadnega rička	6
2.3 KEMIJSKA SESTAVA IN PREHRANSKI POMEN RIČKOVEGA OLJA.....	7
2.3.1 Maščobe (lipidi)	7
2.3.1.1 Maščobe olja navadnega rička.....	9
2.3.2 Steroli.....	10
2.3.2.1 Fitosteroli.....	12
2.3.2.2 Biokemijsko delovanje fitosterolov.....	17
2.3.2.3 Vpliv fitosterolov na metabolizem lipidov	18
2.3.2.4 Vpliv fitosterolov na nižanje koncentracije LDL holesterola pri ljudeh	18
2.3.2.5 Negativni učinki fitosterolov	20
2.3.2.6 Fitosterolemija	20
2.3.2.7 Ocenjeni povprečni dnevni vnos fitosterolov	21
2.4 METODE ZA DOLOČANJE STEROLOV	21
2.4.1 Priprava in čiščenje vzorca.....	22
2.4.1.1 Umiljenje	22
2.4.1.2 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)	22
2.4.2 Plinska kromatografija (določitvena metoda)	22
2.4.2.1 Osnove plinske kromatografije.....	23
2.4.2.2 Parametri kolonske kromatografije	23
2.4.2.3 Detektorji	24
2.4.2.4 Delovanje plinske kromatografije	25
2.5 VREDNOTENJE ANALITSKE METODE.....	26
2.5.1 Validacija analizne metode	26
2.5.2 Osnove statistike in statistični testi	29
2.5.2.1 Osnovni statistični pojmi	29
2.5.2.2 Statistični testi	30

3 MATERIAL IN METODE	34
3.1 MATERIALI	34
3.2.1 Reagenti in materiali	35
3.2.2 Postopek	36
3.2.3 Izračun	40
4 REZULTATI	41
4.1 VALIDACIJA POSTOPKA ANALIZE DOLOČANJA STEROLOV V RIČKOVEM OLJU	41
4.1.1 Ponovljivost in obnovljivost metode	44
4.1.1.1 Brasikasterol	44
4.1.1.2 Kampesterol	46
4.1.1.3 Stigmasterol	47
4.1.1.4 β -sitosterol	49
4.1.2 Standardni dodatek (Recovery)	52
4.1.3 Linearnost	53
4.1.3.1 Betulin	54
4.1.3.2 Brasikasterol	55
4.1.3.3 Kampesterol	56
4.1.3.4 Stigmasterol	57
4.1.3.5 β -sitosterol	58
4.1.4 Stabilnost (obstojnost določenih sterolov v hladilniku kot analizirani vzorec)	60
4.2 STEROLI V RIČKOVEM OLJU	64
4.2.1 Primerjava slovenskih vzorcev z vzorci drugih držav	65
4.2.2 Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za brasikasterol	66
4.2.3 Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za kampesterol	67
4.2.4 Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za stigmasterol	69
4.2.5 Primerjava Slovenskih vzorcev po letniku za β -sitosterol	70
4.3 VREMENSKI PODATKI ZA LETA 2007, 2008 IN 2009	73
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	76
5.1 RAZPRAVA	76
5.2 SKLEPI	79
6 POVZETEK	80
7 VIRI	82

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Maščobnokislinska sestava olja navadnega rička (izraženo kot delež maščobne kisline glede na maso vseh maščobnih kislin (ut. %) (Zubr, 1997; Putnam in sod., 1993; Bešter in sod., 2008).	10
Preglednica 2: Vsebnost brasikasterola, kampesterola, kampestanola, stigmasterola in sitosterola v rastlinskih oljih in industrijskih maščobah (mg/100g) (Schwartz in sod., 2008).	14
Preglednica 3: Vsebnost sitostanola, $\Delta 5$ -avenastanola, 5,24-stigmadienola, gramisterola in cikloartenola v rastlinskih oljih in industrijskih maščobah (mg/100g) (Schwartz in sod., 2008).	15
Preglednica 4: Vsebnost $\Delta 7$ -avenastorla, 24-metilen-cikloartanola, citrostadiola, skupnih sterolov in holesterola v rastlinskih oljih in industrijskih maščobah (mg/100g) (Schwartz in sod., 2008).	16
Preglednica 5: Opis vzorcev ričkovega olja.	34
Preglednica 6: Pripravljeni standardi sterolov in njihove koncentracije.	37
Preglednica 7: Opis uporabljene kolone na GC.	39
Preglednica 8: Pogoji na GC napravi.	39
Preglednica 9: Retenzijski časi (t_R) standardov.	43
Preglednica 10: Koncentracije brasikasterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan). ..	44
Preglednica 11: Koncentracije brasikasterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan). ..	45
Preglednica 12: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za brasikasterol.	45
Preglednica 13: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za brasikasterol.	45
Preglednica 14: Koncentracije kempesterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan). ..	46
Preglednica 15: Koncentracije kampesterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan). ..	46
Preglednica 16: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za kampesterol.	47
Preglednica 17: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za kampesterol.	47
Preglednica 18: Koncentracije stigmasterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan). ..	48
Preglednica 19: Koncentracije stigmasterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan). ..	48
Preglednica 20: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za stigmasterol.	49
Preglednica 21: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za stigmasterol.	49
Preglednica 22: Koncentracije β -sitosterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan).	50

Preglednica 23: Koncentracije β -sitosterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan).....	50
Preglednica 24: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za β -sitosterol.	51
Preglednica 25: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za β -sitosterol.	51
Preglednica 26: Skupno povprečje, standardni odklon in relativni standardni odklon za brasikasterol, kampesterol, β -sitosterol in stigmasterol.	51
Preglednica 27: Določene koncentracije posameznih sterolov v vzorcih V, VM in VR (mg/100 g).	52
Preglednica 28: Pravilnost rezultatov, če vzorcu dodamo standarde sterolov v vzorec pred pripravo vzorca v mg/100 mL.	52
Preglednica 29: Pravilnost rezultatov, če vzorcu dodamo standarde sterolov po pripravi vzorca v mg/100 mL.....	53
Preglednica 30: Rezultati meritev standardnih raztopin betulina za izračun linearnosti.....	54
Preglednica 31: Rezultati meritev standardnih raztopin brasikasterola za izračun linearnosti.	55
Preglednica 32: Rezultati meritev standardnih raztopin kampesterola za izračun linearnosti.	56
Preglednica 33: Rezultati meritev standardnih raztopin stigmasterola za izračun linearnosti.	57
Preglednica 34: Rezultati meritev standardnih raztopin β -sitosterola za izračun linearnosti.	58
Preglednica 35: Obstočnost pripravljenih vzorcev ričkovega olja v hladilniku.....	60
Preglednica 36: Koncentracije sterolov v vzorcih ričkovga olja.....	64
Preglednica 37: Koncentracije sterolov v vzorcih ričkovga olja drugih držav v primerjavi s povprečjem slovenskih.....	65
Preglednica 38 : Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za brasikasterol..... (letnik 2007, 2008, 2009).	66
Preglednica 39: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (brasikasterol).	66
Preglednica 40: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (brasikasterol).	67
Preglednica 41: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (brasikasterol).	67
Preglednica 42: Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za kampesterol..... (letnik 2007,2008, 2009).	68
Preglednica 43: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (kampesterol).	68

Preglednica 44: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (kampesterol).....	68
Preglednica 45: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (kampesterol).....	69
Preglednica 46: Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za stigmasterol.....	69
(letnik 2007,2008, 2009).	69
Preglednica 47: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (stigmasterol).....	69
Preglednica 48: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (stigmasterol).....	70
Preglednica 49: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (stigmasterol).....	70
Preglednica 50: Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za β -sitosterol	71
(letnik 2007,2008, 2009).	71
Preglednica 51: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (β -sitosterol).	71
Preglednica 52: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (β -sitosterol).	71
Preglednica 53: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (β -sitosterol).	72
Preglednica 54: Podatki o vremenu za leto 2007 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).....	73
Preglednica 55: Podatki o vremenu za leto 2008 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).....	74
Preglednica 56: Podatki o vremenu za leto 2009 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).....	74
Preglednica 57: Povprečni vremenski podatki za leta 2007, 2008, 2009 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).	75

KAZALO SLIK

Slika 1: Slika navadnega rička (pred žetvijo).....	3
Slika 2: Ričkovo olje.	5
Slika 3: Kemijska struktura nekaterih sterolov (Moghadasian in Frohlich, 1999).....	11
Slika 4: Shema plinskega kromatografa (Jeseničnik, 2004).....	25
Slika 5: Kolona s pečico (Agilent Technologies, 2002).....	25
Slika 6: Tube Condition strata C 18-E-SPE.	38
Slika 7: Kromatogram vseh standardov skupaj (1 – brasikasterol; 2 – kampesterol; 3 – stigmasterol; 4 – β -sitosterol).	42
Slika 8: Kromatogram vzorca ričkovega olja št. 6 (1 – brasikasterol; 2 – kampesterol; 3 – stigmasterol; 4 – β -sitosterol).	43
Slika 9: Graf linearnosti za interni standard (betulin) z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2	54
Slika 10: Graf linearnosti za brasikasterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2	55
Slika 11: Graf linearnosti za kampesterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2	56
Slika 12: Graf linearnosti za stigmasterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2	57
Slika 13: Graf linearnosti za β -sitosterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2	58
Slika 14: Odvisnost koncentracije brasikasterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.	61
Slika 15: Odvisnost koncentracije kampesterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.	61
Slika 16: Odvisnost koncentracije stigmasterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.	62
Slika 17: Odvisnost koncentracije β -sitosterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.	63

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALA	α -linolenska kislina
CC	kolonska kromatografija
DHK	dokozaheksanojska kislina
ECD	detektor na zajetje elektronov
EPK	eikopentanojska kislina
FID	plamensko ionizacijski detektor
FPD	plamensko fotometrični detektor
GC	plinska kromatografija
HDL	lipoproteini visoke gostote
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IR	infra rdeče
LA	linolna kislina
LDL	lipoproteini nizke gostote
MK	maščobne kisline
MS	masna spektrometrija
NeNMK	nenasičene maščobne kisline
NMK	nasičene maščobne kisline
NMR	nuklearna (jedrska) magnetna resonanca
n-3	omega-tri maščobne kisline
n-6	omega-šest maščobne kisline
n-9	omega-devet maščobne kisline
PID	fotoionizacijski detektor
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu
TID	termoionski detektor
TCD	detektor na osnovi toplotne prevodnosti
TLC	tankoplastna kromatografija
UV	ultravijolično
V	naključni vzorec ričkovega olja
VM	naključni vzorec ričkovega olja z dodano znano količino standardov po pripravi vzorca

VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline
VR	naključni vzorec ričkovega olja z dodano znano količino standardov pred pripravo vzorca
$\bar{x}$	srednja vrednost

1 UVOD

Camelina sativa (L.) Crantz ali navadni riček je v Sloveniji manj poznana poljščina, ki se uporablja predvsem za olje. Rastlina je poznana že več stoletij, danes pa jo v Sloveniji gojijo predvsem na Koroškem, kjer jo imenujejo tudi "toter". Rastlina je ekonomična za pridelovanje in poleg vsega naj bi imelo ričkovo olje visoko dodano vrednost zaradi vsebnosti esencialnih maščobnih kislin. Zaradi te lastnosti bi ga lahko prištevali tudi med funkcionalna živila. V to skupino živil lahko olje uvrščamo tudi zaradi visoke vsebnosti sterolov.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen magistrske naloge je bil validirati metodo za določanje sterolov v ričkovem olju in nato določiti količino najpomembnejših sterolov v nekaj vzorcih treh zaporednih let. Poleg tega je bil namen tudi določitev koncentracije sterolov v olju navadnega rička slovenskega porekla in primerjava s koncentracijo sterolov v olju navadnega rička iz nekaterih vzorcev drugih držav. Namen je bil tudi primerjati koncentracijo sterolov v olju navadnega rička iz različnih letnikov slovenskega porekla, iz analize realnih vzorcev pa na koncu povezati podatke ter poskušati ugotoviti, ali vremenske razmere vplivajo na količino sterolov.

1.2. DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo plinska kromatografija (GC) primerna metoda ob uporabi ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE). Ob tem pričakujemo, da bo validacija te metode primerna glede na vsa priporočila.

Predvidevamo, da se vzorci ričkovega olja slovenskega izvora razlikujejo od vzorcev ričkovega olja drugih držav.

Menimo tudi, da se slovenski vzorci ričkovega olja med seboj ne razlikujejo.

Po drugi strani pa menimo, da podnebne razmere vplivajo na koncentracijo sterolov v olju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NAVADNI RIČEK ALI *Camelina sativa* (L.) Crantz

Navadni riček (*Camelina sativa* L.) spada v družino križnic (*Brassicaceae*). Izvorna rastlina je divji riček, ki je bil pogost plevel na naših njivah in ob poteh. V zgodovini so se za *Camelina sativa* (L.) Crantz uporabljali številni sinonimi *Myagrum sativum* L., *Alyssum sativum* Scop. V nemško govorečih deželah so ga imenovali nepravi lan ("false flax"), pa tudi zlato radosti ("gold of pleasure") (Bavec, 2001). Rode (2002) navaja, da naj bi v Sloveniji imenovali navadni riček tudi "toter".

Arheološke raziskave v Evropi in Skandinaviji kažejo, da so to rastlino pridelovali kot kmetijski pridelek in jo prehransko cenili že pred dva tisoč leti. Seme navadnega rička so uporabljali kot sestavni del pri pripravi različnih kašnih jedi ter kruha za prehrano ljudi, medtem ko je bila beljakovinsko bogata oljna pogača namenjena za krmo živali (Zubr, 2010). Nato se je pojavilo obdobje, ko je bil navadni riček v Evropi označen kot plevel na poljih lanu, vendar pa je bila njegova funkcionalna raba znova obujena v manjšem obsegu v začetku 20. stoletja v severnem delu Evrope in na Balkanu (Zubr, 1997). Pred drugo svetovno vojno in vse do leta 1950 so ga pridelovali kot nadomestek za oljno ogrščico (*Brassica napus*). Olje so takrat, kot tudi danes, uporabljali za kuhanje, kot naravno ljudsko zdravilo in za tehnične namene (Rode, 2002). Predvsem se je povečalo zanimanje za oljnico v zadnjem času v nekaterih državah srednje in severne Evrope, v Severni Ameriki in v Avstraliji, saj je pridelava poljščine zelo ekonomična (zaradi minimalnih vhodnih potreb, to je po dognojevanju, in minimalnih potreb po fitofarmacevtskih sredstvih). Poleg tega pa je razlog za povečano zanimanje za oljnico tudi prehranski, saj ima ričkovo olje visoko vsebnost esencialnih maščobnih kislin in ima zato visoko dodano vrednost (Zubr, 1997).

2.1.1 Morfologija

Rastlina je enoletnica, izredno šibka, z dobro razvejano glavno korenino. Iz listne rozete zraslo steblo je pokončno, visoko 0,3 do 1,0 m in rahlo dlakavo. Steblo in listi so najbolj podobni lanu, socvetje pa je rumeno cvetoč grozd. Plod je hruškast lušček, v katerem so zelo drobna semena rdečkaste barve (Bavec, 2001). Zubr (1997) navaja, da so morfološke

razlike med različnimi oblikami (poletna, zimska, vmesna) izražene predvsem v barvi in obliki listov, obliki kapsul ter semenih in drugih posebnostih. Fiziološke razlike so v glavnem povezane z rastjo in razvojem rastline. Semena navadnega rička, ki so posejana v zemlji, so odvisna od temperature in vlage ter kalijo nekaj dni. Strok vsebuje približno 15 semen, ki so majhna (0,7 mm x 1,5 mm), svetlo rumene barve, ovalne oblike ter imajo dvokapno površino (slika 1). Ko se barva semen spremeni v temno rjavo ali rdečkasto barvo, to nakazuje, da so semena dozorela. Obdobje rasti je kratko, vendar je lahko pridelek jarega navadnega rička do 2,5 t/ha, medtem ko je teža 1000 semen od 0,8 do 1,8 g. Navadni riček lahko gojimo tako poleti kot pozimi, saj je pridelek prilagodljiv in ga lahko uspešno gojimo v različnih podnebnih ter talnih razmerah, saj je rastlina odporna tudi na sušo. Obdobje rasti je v poletnih mesecih približno 120 dni.



Slika 1: Slika navadnega rička (pred žetvijo).

2.1.2 Pridelava in predelava navadnega rička

Kmetje za pridelovanje rička izberejo manjše površine (ki so največkrat opuščene) in jih pripravijo z oranjem ter gnojenjem s hlevskim gnojem. Tak način gnojenja izboljša lastnosti tal, ker jih rahlja in naredi bolj zračna. Seme je drobno in za sejanje ni potrebna specialna mehanizacija. Možno ga je sejati "na široko", predhodno pa ga mešajo s pšeničnim zdrobom ali peskom, tako da preprečijo pregost pridelek. Izkušnje so namreč pokazale, da kadar je riček nasejan preveč na gosto, se vsebnost olja manjša. Največkrat se kmetje poslužujejo vrstičnega načina sejanja, kjer seme sejejo v t.i. sadičvene brazde, saj je tako lažja nadaljna obdelava pa tudi spravilo pridelka. Pomembna je tudi globina sejanja, ki lahko meri največ do 2 centimetra globoko, sicer seme sploh ne vzklje. Tako seme sejejo na površino brazd in nato prekrijejo z zemljo (Pratnekar, 1996).

Med rastjo ni predvidenih nobenih posegov v posevku, razen če je to potrebno (to je na primer ročno pletje plevela, ki zraste med brazdami). Julija rastline oblikujejo značilne semenske glavice, ko pa je okoli 80 % teh glavic že rumeno rjavih, se prične žetev. Če je nasad čist, lahko rastline pokosijo, kadar pa je prisoten plevel, jih populijo. Riček zvežejo v snope, ga posušijo in omlatijo. Seme očistijo in ga shranjujejo v primernih vrečah, na suhem mestu ter tako, da so semena zaščitena pred svetlobo. Tako shranjena semena so obstojna tudi nekaj let. Iz njega nato sproti in po potrebi iztisnejo olje. Olje pridobivajo iz posušenih semen, ki jih najprej zmeljejo, nato pa pomešajo z enako količino vode v gosto rjavo zmes. To naprej pražijo v posebnih pečeh, pri temperaturi 60 do 90 °C tako dolgo, dokler ne postane sipka in na otip suha. Nato to maso prenesejo v stiskalnico in jo stisnejo. Olje prestrežejo in pustijo nekaj dni, da se zbistri. Izkušnje kmetov so pokazale, da iz določene količine semen dobijo približno eno tretjino olja (Pratnekar, 1996).

2.2 RIČKOVO OLJE

Semena navadnega rička vsebujejo približno 42 % olja v suhi snovi pri poletnih sortah semen, medtem ko pri zimskih okrog 45 %. Industrijska obdelava semen za sprostitve olja poteka v dveh korakih, in sicer drobljenje in stiskanje. Med stiskanjem lahko temperatura doseže do približno 100 °C. Tako pridobljeno olje je rumene barve (slika 2) z značilnim okusom. Vendar je potreben še postopek deodorizacije, preden olje uporabimo za prehrano ljudi ali pa v kozmetiki. Filtracija je edini postopek, ki ga opravimo pred deodorizacijo,

tako nevtralizacija, degumacija, beljenje in drugi podobni postopki niso potrebni, saj imajo lahko celo škodljive učinke na kakovost olja. Ker je olje že po naravi zelo čisto, je postopek rafinacije zelo preprost. Preprosta rafinacija olja ima poleg varčevanja z energijo tudi nizke stroške in se izogne stranskim proizvodom (kot so onesnažene vode in tla) (Zubr, 1997). Ričkovo olje je rumeno zelene barve in ima značilen vonj ter okus po križnicah (Przybylski, 2005). Na Slovenskem se ričkovo olje prideluje in predeluje predvsem na Koroškem in na tem območju ga imenujejo tudi "totrovo olje" (Bavec, 2001).



Slika 2: Ričkovo olje.

2.2.1 Oljna pogača

Možnost je uporabiti oljno pogačo za krmo živaio oziroma kot sekundarno surovino, ki nastane po stiskanju semen. Oljna pogača je bogat vir beljakovin, ogljikovih hidratov, mineralov, vitaminov in glukozinolatov, ki so bioaktivni sekundarni metaboliti (Zubr, 2010; Mithen in sod., 2000; Lange in sod., 1995).

2.2.2 Uporaba in izkoriščanje olja navadnega rička

Glede na sestavo olja bi lahko ričkovo olje uvrstili med funkcionalna živila. Za funkcionalna živila se namreč lahko štejejo živila, za katera je dovolj trdno dokazano, da imajo razen svoje hranilne vrednosti še poseben vpliv na zdravje človeka, njegovo fizično in psihično storilnost ter na počutje. Nekatere maščobe se zaradi svoje specifične sestave uveljavljajo, ali pa bi se lahko uveljavile, kot funkcionalna živila ali pa vsaj kot bistvena sestavina za proizvodnjo funkcionalnih živil. Predvsem so to maščobe, bogate z n-3 maščobnimi kislinami, ki pa jih lahko najdemo tudi v ričkovem olju (Salobir, 2001).

Olje navadnega rička se ne uporablja le za prehranske namene. Pri nas ričkovo olje prodajajo v koroških lekarnah v Slovenj Gradcu zaradi lokalnega zanimanja. Tam ga priporočajo za blaženje mnogih težav: pri predmenstrualnih težavah, klimakterijskih težavah, luskavici, multipleks sklerozi, raznih alergijah, težavah s kožo, ranah na želodcu, boleznih srca in ožilja pri sladkornih bolnikih, revmatološkem artritisu, prav tako znižuje tudi holesterol. Kljub temu, da stranski učinki olja niso znani, priporočajo uživanje 1–2 žlički ričkovega olja na dan, s prekinitvijo uporabe po treh mesecih. Po mesecu dni prekinitve se terapija lahko ponovi. Tako pridelovalci na Koroškem gojijo navadni riček le še za te potrebe (Jeseničnik, 2004).

Olje uporabljajo tudi za proizvodnjo talnih oblog (linolej), tiskarskih barv, lakov ali kitov v kemični industriji predvsem zaradi visokega deleža α -linolenske maščobne kisline ($C_{18:3n-3}$) (Friedt in sod., 1994). Olje se lahko uporablja tudi kot surovina za proizvodnjo tenzidov, kozmetičnih dodatkov, biomaziv in biolubrikantov (Jansen in Steffen, 1992). Lahko pa ga uporabljamo tudi za proizvodnjo biodizla, saj ima nižje proizvodne stroške kot olje oljne ogrščice (Frölich in Rice, 2005).

V kozmetični industriji ga delno že vgrajujejo v najrazličnejše kozmetične izdelke, predvsem v tiste, ki so namenjene negi kože. Dodajajo ga k masažnim oljem, oljem za telo, kopelnim izdelkom in raznim losijonom za telo. Lahko se uporablja kot emolien za

mehčanje kože, za zaščito pred vplivi vremena in za izboljšanje elastičnosti kože. Primerno pa je lahko ričkovo olje tudi kot dodatek k raznovrstnim izdelkom za oskrbo las, saj okoli lasnega folikla naredi zaščitni plašč in ga tako zaščiti. Ričkovo olje lahko zelo hitro deluje tudi na zmanjšanje rdečice kože, saj zaradi esencialnih maščobnih kislin pospeši proces celjenja (Jeseničnik, 2004).

Uporaba navadnega rička pa ni omejena le na izdelavo olja. Poleg le-tega se uporabljajo tudi sama semena, oljne pogače in tudi stebila. Stebila se lahko uporabljajo predvsem kot vir biomase ali celuloznih vlaken za izdelavo papirja. Seme pa je visoko hranljivo (saj poleg olj vsebuje tudi do 30 % beljakovin), zato se lahko seme samo ali v obliki pogače uporablja za krmo živali in rejo perutnine (Jeseničnik, 2004)

2.3 KEMIJSKA SESTAVA IN PREHRANSKI POMEN RIČKOVEGA OLJA

Navadni riček je vedno bolj priljubljen alternativni oljni pridelek. Ne goji se ga v velikem obsegu, kljub temu da ima izrazito majhen vpliv na okolje in ima prednost pri univerzalnosti uporabe izdelkov ter specifično kemijsko sestavo, predvsem maščobno kislinsko sestavo. Olja v semenih je 30–40 %, glede na maso suhega semena, vsebuje pa tako nasičene kot nenasičene maščobne kisline. Možen je tudi manjši delež glukozinolatov in sterolov glede na druge križnice. V olju je poleg naštetega tudi relativno visok odstotek tokoferolov (α -, β -, γ -, δ - tokoferol) (Bavec, 2001; Zubr in Matthäus, 2002). Kot pomembna komponenta v ričkovem olju (pa tudi v oljni pogači) so tudi fenoli, ki imajo antioksidativno učinkovitost. V ričkovem olju je njihova vsebnost 760 mg/kg olja in imajo pomembno vlogo, saj so naravni vir antioksidantov ter delujejo tako, da povečajo oksidativno stabilnost olj (Terpinc in sod., 2012; Abramovič in sod., 2007). Antioksidativno učinkovitost v ričkovem olju ima tudi vitamin E (tokoferoli), ki jih je povprečno 700 mg/kg olja (Hrastar, 2011).

2.3.1 Maščobe (lipidi)

Energija je potrebna za ohranitev različnih telesnih funkcij, vključno z respiracijo, cirkulacijo, fizičnim delom in sintezo beljakovin. V hrani je na voljo v obliki ogljikovih hidratov, beljakovin, maščob in alkohola (Baxter, 2008).

Besedo "lipid" uporabljajo kemiki za označitev kemijsko heterogene snovi, katerim skupna lastnost je netopnost v vodi, hkrati pa topnost v nepolarnih topilih (kot so kloroform,

ogljikovodiki ali alkoholi) (Gurr in sod, 2002; Boyer, 2005). 90 % lipidov v hrani namreč predstavljajo triacilgliceroli; večinoma tisti z dolgoverižnimi maščobnimi kislinami (MK). Preostalih 10 % pa v prehrani predstavljajo fosfolipidi (npr. lecitin) in holesterol estri ter v maščobah topni vitamini (Koren, 1992). Lipidi se nahajajo v vseh živih organizmih in igrajo pomembno vlogo tako v živalskem, kakor tudi v rastlinskem svetu. So glavna sestavina bioloških membran, lipidi namreč ločijo celico od zunanjega sveta. Lipidi so tudi glavni vir energije celice in delujejo v živih organizmih kot antigeni, receptorji, električni izolatorji in biološki detergenti. Tudi mnogi hormoni so lipidi (npr. steroidni hormoni). Zanimivo je, da nekateri lipidi obstajajo v naravi tudi v plinastem stanju (npr. feromoni). V živilski tehnologiji se uporabljajo lipidi ne le zaradi njihove prehranske vrednosti, pač pa tudi kot emulgatorji, stabilizacijska sredstva in kot pomembna komponenta v tehnoloških procesih (Klofutar, 1992).

V naravi prisotne MK lahko razdelimo na osnovi prisotnosti dvojnih ali trojnih vezi v dve večji skupini, ki jih imenujemo nasičene ali nenasičene MK. Maščobne kisline (NMK) nadalje delimo glede na dolžino alkilne verige oz. števila ogljikovih atomov na kratkoverižne MK (s 4 do 8 ogljikovimi atomi), srednjeverižne MK (s 10 do 14 ogljikovimi atomi) in dolgoverižne (s 16 do 22 ogljikovimi atomi). Najpogostejše in hkrati najbolj pomembne so tiste, katerih verigo sestavlja 12 do 22 ogljikovih atomov. Nenasičene maščobne kisline (NeNMK) lahko vsebujejo eno ali več dvojnih vezi. Tiste z vsaj eno dvojno vezjo imajo dve možni konfiguraciji *cis* in *trans*, glede na relativni položaj alkilnih skupin. Pri NeNMK se uporabljata izraza "ω" in "n", ki pa se nanašata na položaj prve dvojne vezi v verigi ogljikovih atomov MK, ki se šteje od konca nasproti karboksilne skupine ali najbližje metilnemu koncu molekule (Lobb in Chow, 2008).

Enkrat nenasičene MK igrajo pomembno vlogo za preprečevanje bolezni srca in ožilja, zato je njihov priporočen vnos 10 ali več odstotkov dnevnega energijskega vnosa (Referenčne vrednosti ..., 2004). Priporočljivo je uživanje oljčnega olja, repičnega olja, sojinega olja, saj zmanjšajo LDL holesterol enako uspešno kot večkrat nenasičene MK (VNMK), ne da bi hkrati znižale vsebnost HDL holesterola (Fidler Mis in Širca Čampa, 2009). LDL, ki je skrajšano ime za lipoproteine majhne gostote, imenujemo tudi škodljivi holesterol, saj v telesu holesterolni tovor odlaga na žilno steno in jo s tem oži, medtem ko lipoproteini velike gostote (HDL) odstranjujejo holesterol iz žilne stene (Černe, 2005).

VNMK naj pa bi predstavljale 7 do 10 % dnevnega energijskega vnosa (Referenčne vrednosti ..., 2004). Esencialne MK (to so n-3 in n-6) pa so tiste, ki jih organizem ne more sintetizirati. Pomembno vlogo imajo v rasti in razvoju možganov (Luigi, 2009). Za zdravje človeka je pomembno predvsem pravo razmerje med n-6 in n-3 MK (le-to naj bi bilo idealno, kadar je $n-6 : n-3 = 5 : 1$) (Connor, 2000). n-3 MK najdemo predvsem v mastnih ribah hladnih voda, ribjem olju, algah, oljih iz semen in oreščkov ter v zeleni listnati solati, predvsem pa so n-3 MK pomembne, ker ščitijo pred srčnožilnimi boleznimi, astmo, neenakomernim srčnim utripom, vnetji in znižajo raven trigliceridov v krvi (Jordan, 2010).

2.3.1.1 Maščobe olja navadnega rička

Rastlinsko olje je sestavljeno iz triacilglicerolov. Triacilglicerol je sestavljen iz glicerola in treh maščobnih kislin, ki se razlikujejo glede na dolžino verige in stopnjo nenasičenosti (število dvojnih vezi). Rastlinska olja sestavljajo pretežno nenasičene maščobne kisline, kar ima za posledico, da je večina rastlinskih olj pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju (Lehninger in sod., 1993).

Olje navadnega rička vsebuje približno 50 % VNMK, delež linolne kisline (LA) je približno 15 % ($C_{18 : 2n-6}$) in približno 40 % α -linolenske kisline ($C_{18 : 3n-3}$ -ALA) (Zubr in Matthäus, 2002). Olje navadnega rička vsebuje 15–20 % oleinske kisline ($C_{18 : 1n-9}$) in tudi 15–20 % linolenske kisline ($C_{18 : 2n-6}$), 10–15 % gondojske kisline ($C_{20 : 1n-9}$) in eruka kisline 3 % ($C_{22 : 1n-9}$) (Hrstar, 2011). To olje je edinstveno med skupinami rastlinskih olj, kot so sojino olje, sončnično olje ali olivno olje. Olje navadnega rička se tudi kvalitativno razlikuje od vseh drugih rastlinskih olj zaradi visoke vsebnosti VNMK (preglednica 1). Nedavne raziskave prehrane ljudi so pokazale razmerje med prehrano ljudi in naraščanjem pogostosti civilizacijskih bolezni med prebivalstvom. Prehranska pomanjkljivost je v glavnem pomanjkanje uživanja n-3 MK. Prav zato je olje navadnega rička prehransko tako cenjeno, saj ima visoko vsebnost n-3 MK in je tako odličen vir tudi VNMK, poleg tega pa ima tudi zelo dober profil MK. Poleg vsega navedenega ima olje navadnega rička tudi prehransko vrednost večjo, saj ima dobro ravnotežje n-6 : n-3 (Zubr in Matthäus, 2002).

Preglednica 1: Maščobnokislinska sestava olja navadnega rička (izraženo kot delež maščobne kisline glede na maso vseh maščobnih kislin (ut. %) (Zubr, 1997; Putnam in sod., 1993; Bešter in sod., 2008).

maščobna kislina	navadni riček	oljna ogrščica	oljka	soja	sončnica	lan
palmitinska (C _{16:0})	5,6	6,2	12,8	10,4	6,0	5,1
stearinska (C _{18:0})	2,7	0,0	3,2	4,0	3,8	4,6
oleinska (C _{18:1 n-9})	16,5	61,3	75,3	27,2	17,4	24,3
linolna (C _{18:2 n-6})	16,3	21,5	5,7	45,5	69,3	16,3
α -linolenska (C _{18:3 n-3})	33,7	6,5	0,6	7,2	0,0	45,1
arahidonska (C _{20:0})	1,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
gondojska (C _{20:1 n-9})	15,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
eruka (C _{22:1 n-9})	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9

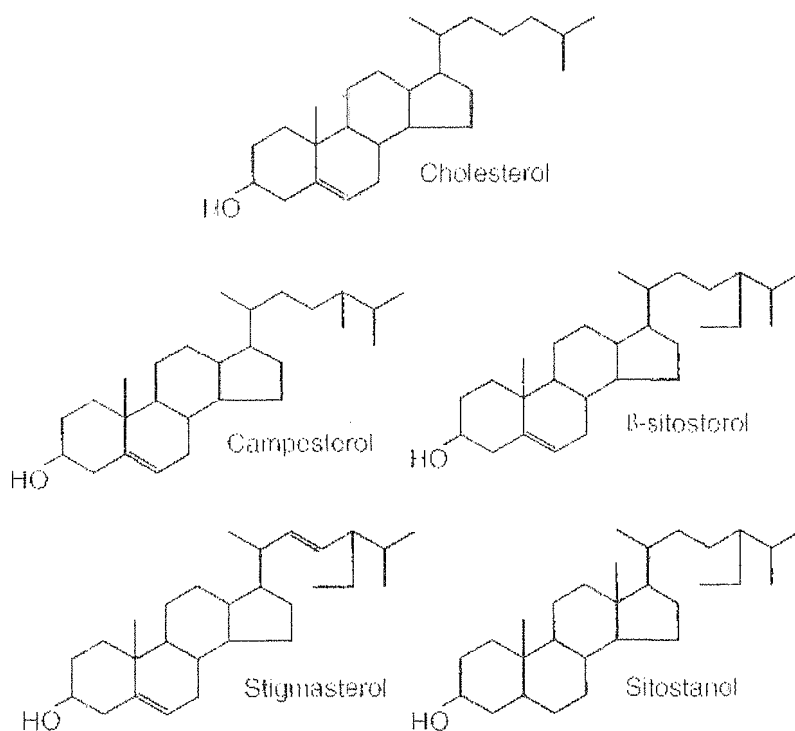
Legenda: Navadni riček (*Camelina sativa*), oljna ogrščica (*Brassica napus*), oljka (*Olea europea*), soja (*Glycine max*), sončnica (*Helianthus annuus*), lan (*Linum usitatissimum*).

2.3.2 Steroli

Steroli so skupina naravnih snovi, izhajajo iz hidroksiliranih izopentoidov. Steroli vsebujejo 27–30 ogljikovih (C) atomov, s stransko verigo C-atomov, ki je pripeta na sedemnajsti C-atom. Struktura sterolov je tesno povezana in različna glede na obseg sprememb v sistemu obročev ter spremembe stranske verige. Tako je tudi število dvojnih vezi, tako v policiklični strukturi in v stranski verigi, lahko različno. (Abidi, 2001). V splošem pa sterole kategorizira avtor v tri razrede:

- I. razred : 4,4-desmetilsteroli;
- II. razred: 4 α -metilsteroli;
- III. razred: 4,4-dimetilsteroli.

Steroli (slika 3) predstavljajo največji delež neumljive faze lipidov. Rastlinske maščobe in olja vsebujejo sterole kot naravno prisotne sestavine (Lagarda in sod., 2006). Rastlinske sterole imenujemo s skupnim imenom kar fitosteroli. Podobno strukturo ima holesterol, ki ga najdemo pri živalih. Kljub vsemu pa se holesterol od fitosterolov razlikuje po svoji sintezi, črevesni absorpciji in presnovi (Moghadasian in Frolich, 1999). V živalskem organizmu je holesterol izhodiščna komponenta oziroma prekursor za sintezo drugih steroidov, kot so spolni hormoni in žolčne kisline ter kortikoidov in vitamina D₂ (Belitz in sod., 2009; Kritchevsky, 2008; Gurr in sod., 2002). Prav tako pa naj bi bili fitosteroli po mnenju avtorja Abidi (2001) pomembni za prehrabetno (s pomembnimi pozitivnimi učinki na zdravje), za kozmetično (kot emulgatorji) in farmacevtsko industrijo (intermediati in prekursorji za proizvodnjo farmacevtskih oblik hormonov).



Slika 3: Kemijska struktura nekaterih sterolov (Moghadasian in Frohlich, 1999).

2.3.2.1 Fitosteroli

Rastlinski steroli (fitosteroli) so bioaktivni sestavni deli vseh rastlinskih živil. Fitosteroli so namreč 28- ali 29-atomarni alkoholi in so, kot že omenjeno, podobni holesterolu pri vretenčarjih glede funkcije (ta pa je, da stabilizirajo fosfolipidno dvoslojno membrano v membranah rastlinskih celic) in strukture (steroidno jedro, 3β -hidroksi skupine, ter dvojna vez na petem in šestem ogljikovem atomu). Fitosteroli sicer vsebujejo poleg navedenega tudi dodatno metilno ali etilno skupino ali pa dodatno dvojno vez. Prav tako pa večina fitosterolov vsebuje na stranski verigi 9–10 ogljikovih atomov, namesto 8 kot jih vsebuje holesterol. Fitosteroli so uvrščeni kot 4-desmetilsteroli iz holestane serije, le-ti pa imajo dvojno vez na petem ogljikovem atomu v obroču. Najpomembnejši naravni viri fitosterolov človeške prehrane so olja in margarine, čeprav se nahajajo tudi v različnih semenih, stročnicah in zelenjavi (Lagarda in sod., 2006).

V rastlinah je več kot 200 različnih tipov fitosterolov, vendar so najpogostejši:

- β -sitosterol (24- α -etilholesterol);
- Kampesterol (24- α -metilholesterol);
- Stigmasterol (Δ^{22} , 24- α -etilholesterol);
- Ergosterol ($\Delta^{7,22}$, 24- α -metilholesterol).

Najbolj pogosti steroli v rastlinah so 4-desmetilsteroli (kot je na primer sitosterol, kampesterol, stigmasterol, 5-avenasterol in 7-avenasterol). V rastlinah je sitosterol prevladujoča oblika saj ga je kar 90 % vseh sterolov. Drugih sterolov, kot so nasičeni stanoli ali steroli, ki so zgodaj sintetizirani po biosintezni poti, se običajno pojavljajo v nižjih koncentracijah (to so 4-monometil, 4,4-dimetil steroli). V živilih se rastlinski steroli lahko pojavijo v več oblikah:

- prosti steroli;
- maščobni estri;
- glikozidi;
- maščobni acil glikozidi.

Zato je določanje skupnih sterolov kot vsota vseh navedenih. Medtem ko holesterol nastane le kot prosta oblika alkoholnih estrov ali holesterilnih estrov (Lagarda in García-Llatas, 2006).

V naravi se lahko steroli nahajajo v prosti obliki ali zaestreni na maščobne ali hidroksicimetne kisline. Lahko pa so glikozilirani s heksozo ali 6-maščobno acil heksozo. Fitostanoli pa so popolnoma nasičena podskupina fitosterolov in so bistvene sestavine žit (koruza, pšenica, rž in riž), sadja in zelenjave, vendar so njihove koncentracije na splošno veliko nižje od tiste nenasičenih fitosterolov. Glede na to, da imajo fitosteroli moč zmanjševanja LDL holesterola in s tem posledično zaščito pred boleznimi srca in ožilja, postajajo živila z visoko vsebnostjo fitosterolov funkcionalna živila, zato se le-ti vedno bolj dodajajo v živila (kot so mazave maščobe, jogurti, mleko) in so na trgu vedno bolj zaželeni (Lagarda in sod., 2006).

Številni fitosteroli naj bi zaradi posebnih struktur zavirali tudi oksidativno poslabšanje olj, saj naj bi imeli potencial za preprečevanje polimerizacije med cvrenjem le-teh (Abidi, 2001).

Schwartz in sod. (2008) so poleg tokoferolov in tokotrienolov raziskali tudi vsebnost fitosterolov v nekaterih jedilnih in industrijskih oljih. Njihovi rezultati so prikazani v preglednicah 2, 3 in 4.

Preglednica 2: Vsebnost brasikasterola, kampesterola, kampestanola, stigmasterola in sitosterola v rastlinskih oljih in industrijskih maščobah (mg/100g) (Schwartz in sod., 2008).

	Koncentracija sterolov (mg/100 g)				
vzorec/sterol	brasikasterol	kampesterol	kampestanol	stigmasterol	sitosterol
olje oljne ogrščice	72,4	297,5	2,24	3,74	406,4
oljčno olje	manj kot 0,1	5,75	manj kot 0,1	2,1	126,5
sončnično olje	1,2	34	6,8	28	206
koruzno olje	3,8	171	15	48	515
kokosovo olje	manj kot 0,1	9,3	manj kot 0,1	12	45
sezamovo olje	-	100	3,1	36	310
laneno olje	2,4	105	2,3	35	206
ričkovno olje	27	117	1,6	5,6	300
olje pšeničnih kalčkov	8,5	969	51	21	2510
orehovo olje	manj kot 0,1	10	manj kot 0,1	1,5	166
mast za cvrtje	24,2	87,3	5,1	6,0	130
margarina	29,3	130	3,7	3,7	184

Preglednica 3: Vsebnost sitostanola, $\Delta 5$ -avenastanola, 5,24-stigmadienola, gramisterola in cikloartenola v rastlinskih oljih in industrijskih maščobah (mg/100g) (Schwartz in sod., 2008).

vzorec/sterol	Koncentracija sterolov (mg/100 g)				
	sitostanol	$\Delta 5$ -avenstanol	5,24-stigmadienol	gramisterol + α -amirin	cikloartenol
olje oljne ogrščice	2,7	32	5,5	4,2	11,4
oljčno olje	4,5	21	manj kot 0,1	1,9	33
sončnično olje	5,1	11	9,9	15	64
koruzno olje	29	21	4,9	8,5	23
kokosovo olje	1,1	19	6	manj kot 0,1	13
sezamovo olje	6,2	47	11	16	27
laneno olje	2,5	59	4,8	6,7	197
ričkovno olje	2,5	37	6,2	1,9	10
olje pšeničnih kalčkov	63	173	44	82	100
orehovo olje	3,0	9,4	2,4	1,2	32
mast za cvrtje	2,9	7,4	2,8	1,2	5,4
margarina	8,9	35,3	51	19,8	7,4

Preglednica 4: Vsebnost Δ^7 -avenastorla, 24-metilen-cikloartanola, citrostadiola, skupnih sterolov in holesterola v rastlinskih oljih in industrijskih maščobah (mg/100g) (Schwartz in sod., 2008).

vzorec/sterol	Koncentracija sterolov (mg/100 g)				
	Δ^7 -avenasterol	24-metilen-cikloartanol	citrostadiol	skupni steroli	holesterol
olje oljne ogrščice	manj kot 0,1	4,3	2,1	845	2,5
oljčno olje	1,2	57	14,5	170	-
sončnično olje	15	15	40	451	-
koruzno olje	4,9	17	9,5	871	1,5
kokosovo olje	manj kot 0,1	3,2	1,6	114	manj kot 0,1
sezamovo olje	6,8	12	19	595	5,1
laneno olje	2,8	60	5,3	689	2,0
ričkovno olje	manj kot 0,1	1	1,3	511	35
olje pšeničnih kalčkov	111	30	79	4240	2,6
orehovo olje	manj kot 0,1	2,1	5,4	234	-
mast za cvrtje	manj kot 0,1	2,1	1,5	266,7	1,5
margarina	manj kot 0,1	2,0	1,7	469,3	1,3

2.3.2.2 Biokemijsko delovanje fitosterolov

Fitosteroli so po kemijski strukturi podobni holesterolu (slika 3). Fitosteroli se pri ljudeh ne sintetizirajo v telesu, ampak jih moramo zaužiti s prehrano, kjer se absorbira le 5 % rastlinskih sterolov. Se pa absorpcija le-teh poveča pri bolnikih s sitosterolemijo in pri redkih motnjah. Stopnja absorpcije se razlikuje med posameznimi rastlinskimi steroli. Izmed zaužitih fitosterolov, tisti, ki se absorbirajo, krožijo v obliki lipoproteinskih delcev bodisi zaestreni ali v nevezani obliki. Medtem ko se neabsorbirani fitosteroli lahko bakterijsko preoblikujejo s črevesno mikrofloro in pri tem proizvajajo bakterije metabolite, kot so koprostanol in koprostanon. Obstaja več možnih razlag, zakaj je stopnja absorpcije fitosterolov različna. Razlika med absorpcijskimi in neabsorpcijskimi steroli se pojavlja med njihovim sprejemom v sluznici črevesja. Počasnejša stopnja prenosa iz celične površine na notranjo stran celice (v primerjavi s prenosom holesterola) lahko prispeva tudi k nižji stopnji absorpcije fitosterolov. Sluznična esterifikacija bi lahko predstavljala pozitivno stran pri razlikah absorpcije sterolov. Rastlinski steroli se lahko kopičijo v jetrih, nadledvični žlezi, jajčnikih ali testisih živali. Te ugotovitve kažejo, da se lahko uporabljajo fitosteroli kot prekursorji steroidnih hormonov (Moghadasian in Frolich, 1999).

2.3.2.3 Vpliv fitosterolov na metabolizem lipidov

Posledica delovanja fitosterolov naj bi bilo zmanjševanje koncentracije holesterola v plazmi, ki je rezultat zaviranja črevesne absorpcije holesterola, vendar ima tudi druge učinke na jetrni in črevesni metabolizem holesterola. Opravljene so bile študije, katerih rezultati kažejo, da naj bi zaviranje črevesne absorpcije (s fitosteroli) vplivalo na jetrno sintezo holesterola, saj fitosteroli stimulirajo jetrno sintezo holesterola "*de novo*", hkrati pa povečana absorpcija holesterola zavira jetrno sintezo holesterola. Prehransko vneseni fitosteroli lahko povzročijo povečanje izločanja holesterola v jetrih. Niso pa še podani prepričljivi podatki o vplivu fitosterolov na sintezo žolča v jetrih (Moghadasian in Frolich, 1999).

Ena od študij (kjer so porabili 50 g oljčnega olja na dan) je bila povezana s povečanjem vsebnosti sitosterola v LDL delcih in zmanjšanjem *in vitro* lipidne peroksidacije in *in vitro* vnos z makrofagi. Tako tisti LDL, ki je bil modificiran (ali s fitosteroli ali s premikom v maščobnokislinsko sestavo), morda kaže antiaterogene lastnosti zaradi svoje odpornosti na peroksidacijo. Znatno zmanjšanje vsebnosti celičnega holesterola so opazili tako pri človeških fibroblastih kože in HepG2 celicah, ki so jih inkubirali iz liposomov in vsebujejo tudi sitosterol. To pa spremlja hkratno povečanje mobilne celične koncentracije sitosterola. Inkubacija linije tumorskih celic debelega črevesa (CaCo-2) z β -sitosterolom, je zmanjšala več vidikov presnove holesterola, vključno s sprejemom holesterola iz prenosnega medija, sintezo holesterola ter aktivnostjo 3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A (HMG-CoA) reduktaze. Epidemiološke raziskave pa kažejo tudi to, da naj bi fitosteroli pri živalih zavirali rast tumorjev, prav tako pa naj bi imeli pozitivne učinke tudi na motnje prostate (Moghadasian in Frolich, 1999).

2.3.2.4 Vpliv fitosterolov na nižanje koncentracije LDL holesterola pri ljudeh

Moghadasian in Frolich (1999) sta pregledala več študij in ugotovila, da se je pri ljudeh, ki so uživali fitosteroles (iz rastlinskih dodatkov), koncentracija LDL holesterola znižala še bolj, kot se je znižal skupni holesterol. Ob fitosterolni ali fitostanolni terapiji naj bi se namreč za 13 % znižala koncentracija LDL holesterola in za 10 % koncentracija skupnega holesterola. Da imajo fitosteroli učinek zniževanja koncentracije holesterola v krvi, obstajajo trdni dokazi, ni pa znano, če je enako učinkovito, da za zniževanje koncentracije holesterola uživamo prehrano z nizko vsebnostjo maščob. Sitostanol (ki je popolnoma

nasičen fitosterol), je namreč močan zaviralec črevesne absorpcije holesterola in je izmed vseh fitosterolov najbolj učinkovit pri zmanjševanju koncentracije holesterola v plazmi. Prav tako pa naj bi bile tudi mešanice sterolov in stanolov tako učinkovite kot stanol sam. Poleg pozitivnega učinka na hiperholesterolemijo pri odraslih, imajo fitosteroli dokazane pozitivne učinke tudi pri otrocih, ki so hiperholesterolemijo podedovali.

Steroli so se sprva uporabljali kot farmakološka sredstva, vendar so s priznavanjem prehranskih učinkov počasi postajali del običajne prehrane v živilih v obliki konvencionalne prehrane. Na začetku so se vključevali v margarine, vendar se je z izboljšano tehnologijo izboljšala tudi biološka razpoložljivost fitosterolov v živilih (kjer so dodani), tako se sedaj dodajajo tudi v sadne sokove, sladoled in druga živila. V prihodnosti pa lahko pričakujemo, da bo živil, kamor se bodo dodajali steroli, še več. Avtor opisuje tudi rezultate analiz, kjer so ugotovili, da je optimalni dnevni odmerek sterolov in stanolov 2 g/dan, saj takšen odmerek povzroči 10 % znižanje ravni LDL holesterola, medtem ko naj bi večji odmerki zagotavljali le majhen dodatni učinek (Kritchevsky in Chen, 2005).

Lagarda in sod. (2006) navajajo, da se sitosterol že od leta 1950 uporablja kot dodatek v zdravilu za hiperholesterolemijo, saj fitosteroli znižujejo skupni holesterol in LDL holesterol, ker zmanjšujejo absorpcijo holesterola. Fitosteroli učinkujejo na ta način, da zavirajo privzem s prehrano zaužitega in endogeno proizvedenega holesterola iz črevesja, vendar pa kljub vsemu natančen mehanizem še ni povsem razjasnjen. Ena od teorij govori o tem, da se holesterol v črevesju (kjer je že rahlo topen) obori v ne-absorpcijsko obliko, to pa se zgodi ob prisotnosti sterolov in stanolov. Druga od teorij pa temelji na dejstvu, da mora holesterol "vstopiti" v žolčne soli in fosfolipide, ki jih vsebujejo "mešane micle", da se lahko absorbira v krvni obtok. Ker pa je holesterol premalo topen v teh micelah in ga fitosteroli (in stanoli) izpodrinejo, na ta način tudi preprečijo njegovo absorpcijo. Poleg tega, da imajo fitosteroli učinek zniževanja koncentracije holesterola, imajo tudi blagodejni učinek za zaviranje razvoja raka debelega črevesja, antiaterosklerotičen učinek, delujejo protivnetno in tudi kot antioksidanti.

2.3.2.5 Negativni učinki fitosterolov

Povečana koncentracija fitosterolov v membranah eritrocitov ima lahko za posledico krhkost. Povečano togost membrane pa je bilo mogoče opaziti tudi v mikrosomih podganjih jeter, ki so bila obogatena z β -sitosterolom in kampesterolom. Prav tako lahko visoka raven β -sitosterola (do 0,7 mmol/L) povzroči *in vitro* krčenje človeških endotelijskih celic v krvi popkovine. Te ugotovitve kažejo, da imajo zelo visoke koncentracije β -sitosterola v plazmi, lahko potencialno citotoksične učinke ter da lahko vplivajo na celične funkcije. Visoke koncentracije fitosterolov pri živalih imajo lahko škodljive učinke tudi na reproduktivne organe. Subakutna doza je 0,5 do 5 mg/ kg telesne teže na dan, saj je ta količina β -sitosterola povzročila znatno zmanjšanje števila semenčic in mod pri podganah (Mogadasian in Frolich, 1999).

Po drugi strani pa sta Kritchevsky in Chen (2005) ob pregledu literature ugotovila, da fitosteroli in njihovi estri, fitostanoli in njihovi estri, nimajo na človeški organizem nobenih škodljivih učinkov na zdravje, prav tako naj ne bi vplivali na celične funkcije. Po njegovem pregledu omenjene spojine tudi niso mutagene, kancerogene in ne vplivajo na razmnoževalne organe.

2.3.2.6 Fitosterolemija

Fitosterolemija (sitosterolemija) je redka avtosomno recesivna motnja, kjer je koncentracija fitosterolov zelo visoka (Moghadasian in Frolich, 1999). Kritchevsky in Chen (2005) navajata, da gre za genetsko napako, ki je posledica mutacij. Gre za napako v genih, ki nadzorujejo delovanje transporterjev (za razlikovanje med holesterolom in steroli) in črpalk v črevesnem lumnu. Tako povečana absorpcija fitosterolov vodi do sitosterolemije. Fitosterolemičnim bolnikom zmanjša tudi dejavnost HMGCoA reduktaze in povečanje jetrnih LDL receptorjev. Enako je dejavnost dveh encimov žolčnih kislin (sterol 27-hidroksilaze in holesterol 7 α -hidroksilaze) inhibirana pri bolnikih s homozigotno fitosterolemijo (Moghadasian in Frolich, 1999).

2.3.2.7 Ocenjeni povprečni dnevni vnos fitosterolov

Kritchevsky in Chen (2005) opisujeta tudi rezultate analiz, kjer so ugotovili, da je optimalni dnevni odmerek sterolov in stanolov 2 g/dan, saj takšen odmerek povzroči 10 % znižanje ravni LDL holesterola, medtem ko naj bi večji odmerki zagotavljali le majhen dodatni učinek.

Lagarda in sod. (2006) navajajo, da je ocenjen povprečni dnevni vnos uživanja fitosterolov med 160 do 400 mg, odvisno od populacije. Se pa rastlinski steroli manj učinkovito absorbirajo, saj je njihova absorbcija 2–5 %, medtem ko se holesterola absorbira kar 60 %. So pa fitostanoli še manj učinkoviti glede njihove absorbcije kot fitosteroli.

2.4 METODE ZA DOLOČANJE STEROLOV

Težka naloga je oceniti koncentracijo sterolov, ki so pomešani z drugimi neumljivimi komponentami v lipidih, le-ti pa so v živilih povezani v kompleksne matrikse. Poleg tega taka analiza zahteva zanesljivo analizo tehniko za ekstrakcijo, izolacijo, separacijo, čiščenje, detekcijo in kvantitativno določitev. Izolacija in obogatitev sterolov iz rastlinskih tkiv ali olj, pomeni začetno solventno ekstrakcijo, superkrično tekočinsko ekstrakcijo, kateri sledijo različna čiščenja in kromatografski postopki. Za nadaljnjo karakterizacijo in kvantifikacijo komponent sterolov, lahko surove izolate prečistimo in ločimo z različnimi kromatografskimi tehnikami, kot so kolonska kromatografija (CC), plinska kromatografija (GC), tankoplastna kromatografija (TLC), visokoločljivostna tekočinska kromatografija na normalni fazi (HPLC). Sterole lahko detektiramo s plamensko ionizacijsko detekcijo (FID), UV detekcijo (UV), z infrardečo spektroskopijo (IR), z nuklearno magnetno resonanco (NMR) ali z masno spektrometrijo (MS). Ko so se začele pojavljati nove sofisticirane GC kolonske tehnologije, je ločevanje zmesi sterolov postalo bolj učinkovito. Opravljena je bila tudi bežna raziskava, ki je pokazala, da v večini raziskovalci raje izbirajo kapilarne GC tehnike za analize sterolov in sorodnih spojin. Razlog za to je ta, da naj bi GC zagotovil večjo selektivnost za določene izomere kot HPLC (Abidi, 2001).

2.4.1 Priprava in čiščenje vzorca

Izmed vseh kromatografskih tehnik izolacije/separacije CC in TLC postopki predstavljajo najbolj dostopno opremo in instrumente, ne glede na njihovo očitno neustreznost in analitično natančnost. Trdno-fazna ekstrakcija (SPE) pa je tudi zelo pogosto uporabljena tehnika čiščenja.

2.4.1.1 Umiljenje

Umiljenje (saponifikacija) je hidroliza spojine alkohola in soli organskih kislin. Gre za reakcijo med bazami alkalijskih kovin in maščobami, tako baza alkalijske kovine (NaOH ali KOH) pretrga vezi estra in povzroči nastanek maščobnih kislin in glicerola. Snovi, ki nastanejo pri umiljenju lahko spremenimo v milo.

2.4.1.2 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)

Znano je že, da so CC ali TLC postopki zelo dolgotrajni in mučni za izvajanje, kadar jih uporabljamo za čiščenje oljnih izvlečkov ali neumljivih frakcij, ki vsebujejo različne razrede komponent (kot so na primer: karoteni, tokoferoli, tokotrienali, linearni maščobni alkoholi, triterpenski alkoholi in steroli). SPE tehnika se je izkazala kot uspešna alternativa za analize rastlinskih olj, saj ima kar nekaj prednosti pred CC in TLC. Prednosti so, da je mogoče narediti analizo v krajšem času, pri tem pa uporabimo le majhno količino topila, poleg tega pa je pri reverzno-faznem načinu optimalno to, da se vzorec ne-saponifikacijskega ekstrakta nanese na oktadecil-silika SPE vložek, ki je vnaprej pripravljen zaporedno. Izpiranje SPE vložka s kloroformom in metanolom nam nudi prečiščene frakcije sterolov. Po izparevanju topila je lahko vzorec pripravljen za kvantifikacijo s GC (Abidi, 2001).

2.4.2 Plinska kromatografija (določitvena metoda)

GC je najbolj pogosta metoda za analizo sterolov, saj je tehnologija zelo napredna v razvijanju kolon. Kapilarne GC kolone namreč (0,1–0,3 mm) vsebujejo ustrezno prevleko in kemijsko vezano stacionarno fazo s spremenljivo polarnostjo (Abidi, 2001). Avtor navaja, da lahko pri uporabi visoke temperature v kapilarni koloni GC, dosežemo visoko stopnjo občutljivosti in dobro ločljivost komponent. V tipični analizi GC je naprava povezana s FID detektorjem za spremljanje analitov v koloni ali z MS za strukturno

identifikacijo in kvantifikacijo z enkratnim spremljanjem ionov (SIM) ali z multiple-ion monitoringom (MIM). Pri FID sistemih ugotavljamo pomanjkanje selektivnosti in specifičnosti, zato se za GC-FID analizo predhodno naredi CC in/ali TLC ali SPE za čiščenje in predobdelavo ne-saponifikacijskih vzorcev. Drugi detektorji se po mnenju avtorja uporabljajo manj pogosto, saj ima FID najboljše funkcije pri GC v smislu občutljivosti detekcije, linearnega odziva in splošnega odziva.

Abidi (2001) navaja GC metodo kot bolj analitično natančno in občutljivo v primerjavi s HPLC. Pri tem pa je občutljivost odvisna od strukture sterolov in detektorjev, ki so priklopljeni na kromatografsko napravo.

2.4.2.1 Osnove plinske kromatografije

Kromatografija je učinkovita separacijska metoda s številnimi aplikacijami na različnih področjih znanosti in tehnologij. Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda za ločitev tekočih ali plinastih zmesi v prostorsko ločene cone. Osnova kromatografske separacije je v razliki hitrosti migracije posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (ki je plin ali tekočina) zaradi selektivnega zadrževanja (retenzije) komponent na stacionarni fazi (ki je trdna površina ali nemobilna tekočina) (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Plinska kromatografija je metoda za ločitev in kvantitativno določitev spojin, ki imajo primeren parni tlak (hlapnost) ter so termično stabilne pri delovnih temperaturah. Ločitev poteka na osnovi porazdelitve komponent v vzorcu med mobilno fazo (He, N₂) in stacionarno fazo. Za detekcijo so na voljo občutljivi in selektivni detektorji (Jeseničnik, 2004).

2.4.2.2 Parametri kolonske kromatografije

Informacija (ki jo daje kromatografski eksperiment) je na kromatogramu, kjer je koncentracija ali masni profil komponent vzorca zapisana kot funkcija gibanja mobilne faze. Kromatogram nam daje informacijo o:

- kompleksnosti vzorca (število vrhov);
- kvalitativni sestavi vzorca (položaj vrhov);
- količini posamezne komponente v vzorcu (površina vrhov).

Interpretacija rezultatov zahteva poznavanje termodinamskih, kinetičnih in transportnih pojavov, ki se vršijo med kromatografsko separacijo. Vse to omogoča izvedbo učinkovite separacije kompleksnih mešanic in tudi izvedbo ustreznih fizikalno-kemijskih meritev

(Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Avtorja navajata tudi najpomembnejše parametre kromatografije, in sicer **čas retenzije** (zadrževalni čas), ki je pri danih pogojih karakterističen za določeno komponento v vzorcu. Kot pomemben parameter avtorja navajata tudi **selektivnost kolone**, ki se nanaša na zmožnost kolone, da loči dve komponenti. Kot pomemben parameter avtorja opisujeta **ločljivost** med dvema vrhovoma.

2.4.2.3 Detektorji

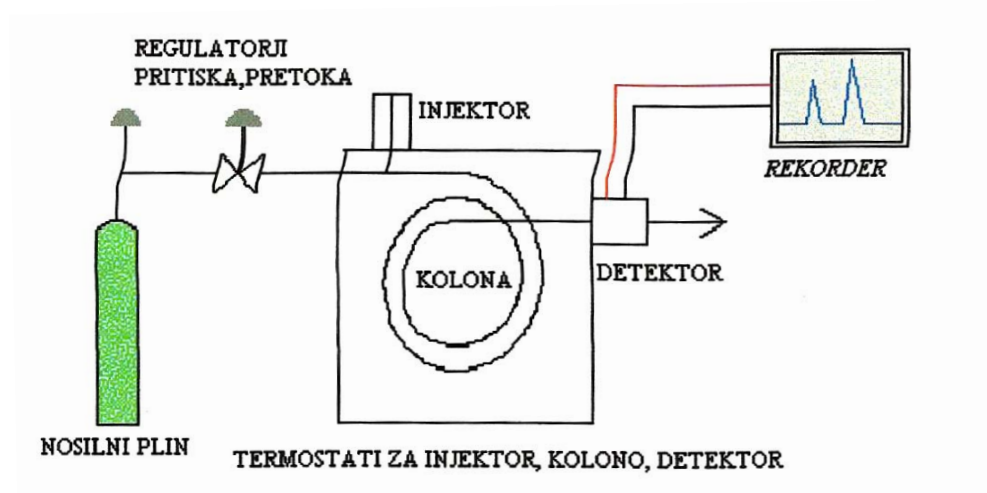
Rudan-Tasič in Klofutar (2007) opisujeta različne detektorje za GC. Po njunem mnenju naj bi bile želene karakteristike idealnega detektorja za GC visoka občutljivost, stabilnost, dobra ponovljivost, širok linearen odziv, kratek in od hitrosti pretoka neodvisen odzivni čas, velika selektivnost, nedestruktivnost vzorca, poleg vsega navedenega pa naj bi bili GC-detektorji odzivni v širokem temperaturnem intervalu (to je od sobne temperature pa vsaj do 400 °C). Avtorja navajata različne detektorje:

- detektor na osnovi toplotne prevodnosti (TCD – angl. Thermal conductivity detector);
- plamensko-ionizacijski detektor (FID – angl. Flame ionization detector);
- plamensko-fotometrični detektor (FPD – angl. Flame photometric detector);
- fotoionizacijski detektor (PID – angl. Photoionization detector);
- termoionski detektor (TID – angl. Thermoionic detector);
- detektor na zajetje elektronov (ECD – angl. Electron capture detector).

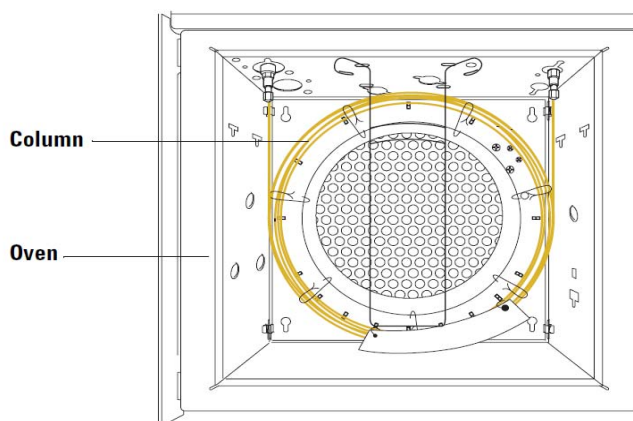
Pri rutinskem delu se po mnenju avtorjev največkrat uporabljata detektorja FID in ECD; prvi je skoraj univerzalen za večino organskih spojin (a deluje destruktivno), z visoko občutljivostjo in širokim linearnim področjem. ECD-detektor pa se na široko uporablja v kemiji okolja, saj selektivno detektira spojine, ki vsebujejo halogene elemente (npr. pesticide, poliklorirane bifenoale). Zelo je občutljiv na molekule, ki vsebujejo funkcionalne spojine z elektronegativnimi elementi (halogeni, peroksidi, kinoni, in nitro-spojine), občutljiv pa je tudi na amine, alkohole in ogljikovodike. Na vzorec ne deluje destruktivno, linearno področje delovanja pa je nekoliko omejeno na dva velikostna razreda. Detektor TCD je edini univerzalni detektor za vse spojine, ki jih lahko separiramo na GC-koloni. Ima široko linearno področje delovanja. Ker je nedestruktiven, ga lahko uporabimo tudi v preparativni plinski kromatografiji. Zaradi nizke občutljivosti pa ni primeren za analizo sledov.

2.4.2.4 Delovanje plinske kromatografije

Plinski kromatograf (slika 4) je instrument, ki ga sestavljajo trije glavni deli (ki so med seboj povezani): injektor, kromatografska kolona (slika 5) in detektor. Raztopino preiskovanega vzorca injiciramo v vroč prostor injektorja, kjer pride do hitrega uparivanja vzorca. Skozi kolono (napolnjeno s stacionarno fazo) vodimo plin (mobilna faza). Zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti se komponente vzorca med seboj ločijo. Pri izstopu iz kolone posamezno komponento zazna detektor, ki pošlje ustrezen signal rekorderju oziroma integratorju glede na koncentracijo posamezne komponente. Na osnovi časa zadrževanja posamezne komponente v koloni (retenzijski čas (t_r)) to komponento identificiramo, glede na velikost signala pa ga kvantitativno ovrednotimo.



Slika 4: Shema plinskega kromatografa (Jeseničnik, 2004).



Slika 5: Kolona s pečico (Agilent Technologies, 2002).

2.5 VREDNOTENJE ANALITSKE METODE

Zagotavljanje kakovosti je sistem aktivnosti, ki daje proizvajalcu ali uporabniku produkta zagotovilo, da ta ustreza definiranim standardom kakovosti na predpisanem nivoju zaupanja. Standardi kakovosti zahtevajo validacijo vsake analitske metode ne glede na to ali smo jo razvili sami ali jo uvajamo po navodilih neke druge institucije. Vrednotenje metode prikažemo z določenimi parametri in s tem zagotovimo, da je metoda ustrezna za analizo določene substance v vzorcu ter da daje zanesljive rezultate. Nujno pa je poznavanje fizikalno-kemijskega procesa, na katerem temelji analiza, ker se ta proces dogaja v instrumentalnem sklopu in ne na doseg analitikovih oči. Tako podatke o poteku analize dobiva analitik posredno preko digitalnega zapisa znakov, signalov ali števil. Razumevanje in pravilna obdelava podatkov sta zelo pomembna za kvaliteto in zanesljivost analiznih rezultatov, v nasprotnem primeru namreč prihaja do velikih merilnih napak. Prav to je razlog za uradno uvajanje zahtev po validaciji analiznih postopkov.

2.5.1 Validacija analizne metode

Validacija analizne metode je postopek, s katerim ovrednotimo karakteristike analizirane analizne metode in potrdimo, ali je metoda primerna za določeno analitsko aplikacijo ali ne. Z validacijo analizne metode dokažemo, da so izpolnjene vse zahteve, ki so predpisane za določeno analizno metodo. Zahteve so podane s standardi ali pa so predpisane s tehnično specifikacijo. Običajne zahteve so: pravilen rezultat meritve, ustrezna merilna negotovost meritve, cena meritve in rezultat analize v dogovorjenem roku. Rezultat validacije metode je potrditev s pomočjo preverjanja in s pripravo objektivnih dokazov, da so izpolnjene zahteve za specifične namene uporabe. Za uspešno validacijo metode mora oprema ustrezati specifikacijam, biti mora vzdrževana in umerjena. Izvajalec validacije pa mora imeti ustrezno strokovno predznanje (Moder, 1998).

Avtorica Moder (1998) navaja, da je validacija metode tesno povezana z razvojem metode, tako da ne moremo postaviti jasne razmejitve med obema postopkoma. Postopek validacije metode razdelimo na več korakov:

- oblikovanje zahtev oziroma oblikovanje analitske specifikacije;
- izbira analitske metode, ki jo bomo validirali, in izbira tehnike za preverjanje točnosti in natančnosti analitske metode;

- določitev parametrov validacije, ki jih bomo ovrednotili;
- izdelava protokola (sheme) za izvedbo validacije;
- izvedba meritev in obdelava rezultatov;
- primerjava dobljenih rezultatov validacije z zahtevami standarda ali predpisov.

Pri validaciji analizne metode lahko uporabljamo eno ali kombinacijo več tehnik za preverjanje točnosti in natančnosti analizne metode. Pred pričetkom same validacije je pomembno, da naredimo protokol oziroma shemo kako in v kakšnem vrstnem redu bomo izvajali določene meritve (Moder, 1998). Validacija analitske metode:

- **Specifičnost in selektivnost** (specifity and selectivity) metode ugotavljamo tako, da analiziramo različice istega vzorca in opazujemo merjeno lastnost elementa, ki ga določujemo. Vzorcem lahko dodajamo nečistoče ali moteče snovi in opazujemo vpliv le-teh na merjeno lastnost elementa. Analizna metoda je selektivna, če na merjeno lastnost (npr. intenziteta signala pri ICP-AES) elementa v mešanici ne vpliva nobena druga komponenta iz te mešanice. Metodo, ki je popolnoma selektivna, imenujemo specifična (Moder, 1998).
- **Linearnost** (linearity) določimo tako, da izmerimo signal slepe raztopine in standardnih raztopin različnih koncentracij v celotnem delovnem območju ter izračunamo regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov. Zaželeno je, da bi bila analizna metoda znotraj delovnega območja linearna. Standardne raztopine različnih koncentracij in slepo raztopino pripravimo v več paralelkah. Preverjanje linearnosti regresijske premice (umeritvene krivulje) je le del validacije celotne analizne metode. Umeritvena krivulja je linearna, če je koeficient korelacije $R^2 \geq 0,99$. Če umeritvena krivulja ni linearna na vsem delovnem območju, lahko delovno območje razdelimo na več manjših območij in znotraj njih testiramo linearnost. Če umeritvena krivulja kljub temu ni linearna, moramo v analizo metodo vključiti ustrezno enačbo za umeritveno krivuljo (Moder, 1998).
- **Natančnost** (precision) metode pove, koliko rezultati meritev znotraj skupine meritev med seboj nihajo (in je odvisna od koncentracije analita). Natančnost analizne metode običajno podajamo kot standardni odmik analizne metode. Določimo jo tako, da izmerimo več meritev realnega vzorca (Moder, 1998).

Natačnost metode podajamo na dva načina, odvisno od tega pod katerimi pogoji smo jo določili:

- a) **Ponovljivost** (repeatability) je natančnost dobljena iz rezultatov meritev pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti reagenti, ista oprema, isti analitik, isti laboratorij, isti set vzorcev, kratek čas med meritvami). Ponovljivost metode opiše namreč kakovost ujemanja cele vrste rezultatov, narejenih pri enakih pogojih (Zupan, 2009).
- b) **Obnovljivost** (reproducibility) nastopa, kadar je natančnost dobljena iz rezultatov meritev pri obnovljivih pogojih. Tako je v nasprotju z ponovljivostjo obnovljivost kakovost ujemanja med posameznimi rezultati meritev, dobljenih z isto metodo in/ali na istem materialu ali objektu, vendar pri različnih pogojih, kot so npr. drug analitik, druga aparatura, a za isto metodo, drug laboratorij, drug čas, ... Z F-testom (primerjavo varianc) določimo natančnost dveh skupin meritev (Zupan, 2009)
- **Točnost ali pravilnost** (accuracy) je merilo, s katerim pokažemo, da dobimo z uporabo določene analitske metode pravilne rezultate. Točnost je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Pravo vrednost dobimo na dva načina. Eden je primerjanje rezultatov z referenčno metodo, za katero vemo, da nima systemske napake. Manjša kot je razlika med povprečjem meritev in "pravo" (referenčno) vrednostjo, bolj je metoda točna. Drugi način je dodajanje znane koncentracije merjene komponente v matrično raztopino in merjenje pripradajočih signalov. Ta drugi način lahko imenujemo tudi "**recovery**" (**standardni dodatek**), kjer merimo razliko v rezultatu za vzorec brez in z dodano znano količino analita. Točnost rezultatov, ki jih dobimo z neko metodo, določimo s t-testom, ki primerja prave vrednosti in povprečje skupine meritev. Pravilnost rezultatov izračunamo iz razlike med izračunano koncentracijo in dejansko koncentracijo (enačba 1).

$$\text{pravilnost} = \left(1 + \frac{Y_{\text{izrač}} - Y_{\text{def}}}{Y_{\text{def}}} \right) \times 100 \quad \dots (1)$$

- **Stabilnost** (stability) podaja velikost odstopanj v analiziranih rezultatih, narejenih v različnih časovnih intervalih. Stabilnost je potrebno preverjati, ker mnoge komponente vzorca razpadejo med samo pripravo vzorca ali med opravljanjem meritev. Sistem stabilnosti je primerljiv, če relativni odmik ne presega 20 % celotne natančnosti. V primeru, da je vrednost večja, moramo izračunati čas uporabe raztopine (Nemivšek, 2006). Časovni vpliv shranjevanja izolatov vzorcev preverjamo z meritvami v zaporednih časovnih intervalih in primerjanjem izmerjenih vrednosti z začetno.

2.5.2 Osnove statistike in statistični testi

Statistika je veda, ki je del matematike in se v zadnjem času veliko uporablja tudi na področju načrtovanja eksperimentov. Statistične metode nam pomagajo pri vrednotenju in podajanju rezultatov, iskanju virov različnih sistemskih napak, ocenjevanju velikosti napak, pri primerjavi različnih metod, različnih analitikov, načinov dela, različnih vzorcev, itd. (Bohanec, 1998).

2.5.2.1 Osnovni statistični pojmi

Vsak rezultat merjenja mora vsebovati podatek o napakah, zato se izvajajo vse analize v več ponovitvah. Ponovitve so analize, ki jih naredimo večkrat pod enakimi pogoji. Število ponovitev pa je odvisno od vrste analize, časa (ki je potreben za analizo), rutinske analize (ali nerutinske), od števila vzorcev in pa tudi drugih dejavnikov. Statistično gledano je šest ponovitev pravzaprav minimalno število ponovitev, ki jih moramo narediti, da lahko ovrednotimo nek rezultat. Iz rezultatov posameznih meritev vzorčnih predstavnikov iz neke populacije lahko sklepamo na celotno populacijo, iz katere jemljemo vzorec (Bohanec, 1998). Osnovni statistični pojmi pa so:

- **Povprečje meritev**, ki je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od povprečja meritev in je torej merilo odstopanja vrednosti posameznih meritev od povprečne vrednosti meritev (enačba 2).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

... (2)

- **Standardni odmik** povprečja ali standardna napaka je količnik standardnega odmika s in korena števila ponovitev n (enačba 3).

$$\frac{s_x = s}{\sqrt{n}} \quad \dots (3)$$

- **Koeficient variacije ali relativni standardni odmik** je standardni odmik izražen v odstotkih glede na povprečno vrednost meritev (enačba 4).

$$RSD = \frac{s \times 100 \%}{\bar{x}} \quad \dots (4)$$

2.5.2.2 Statistični testi

Pri interpretaciji eksperimentalnih rezultatov, primerjavi podatkov in iskanju povezav med različnimi skupinami podatkov si pomagamo z različnimi testi, ki z določeno verjetnostjo potrdijo ali ovržejo določene trditve (Bohanec, 1998). Spodaj naštetih so najosnovnejši statistični testi:

- **Q-test za določitev zunaj ležečih meritev (ubežnikov)**

Večkratne ponovitve analize pod enakimi pogoji sestavljajo skupino meritev. Pred njihovo statično obdelavo in določitvijo osnovnih statističnih parametrov (povprečje, standardni odmik, interval zaupanja) meritve pogledamo in poskušamo ugotoviti, če katera od meritev zelo odstopa od ostalih. Take meritve imenujemo zunaj ležeče meritve ali ubežniki (outliers) in vplivajo na točnost ter natančnost meritev. Pred nadaljnjo statistično obdelavo jih določamo in izločimo s pomočjo enega od znanih statističnih testov, in sicer uporabimo Dixonov Q-test ali pa Grubbs-Beckov test (Bohanec, 1998).

Dixonov Q-test je zelo enostaven za določanje zunaj ležečih meritev, pri katerem se Q-vrednost določi po enačbi 5.

$$Q_{\text{tabel}} = \frac{|OM - NM|}{(MAX - MIN)}$$

... (5)

OM = opazovana meritev, ki jo želimo izločiti;

NM = meritev, ki je najbližje opazovani meritvi;

MAX = maksimalna meritev;

MIN = minimalna meritev.

Vrednost $Q_{\text{izrač}}$ primerjamo s tabelarično vrednostjo $Q_{\text{tabelarična}}$. Če je $Q_{\text{izrač}} > Q_{\text{tabelarična}}$, potem je meritev OM izločena. Če pa je $Q_{\text{izrač}} < Q_{\text{tabelarična}}$, potem OM ni zunajležeča meritev in je ne izločimo. Dixonov Q-test pa odpove, če sta dve meritvi blizu skupaj, vendar daleč od ostalih ali pa če poleg skupine meritev obstajata še dve meritvi zunaj te skupine, vsaka na svoji strani (Bohanec, 1998).

- **Grubbs-Beckov test:**

Uporabljamo kadar Q-test odpove, vendar je pri tem testu primerjava med izračunano in tabelarično vrednostjo ravno obratna kot pri ostalih testih (enačba 6) (Bohanec, 1998).

$$z_i = \frac{y_{im} - \bar{y}_i}{s_i} \quad \dots (6)$$

s_i = standardni odmik signalov;

$\bar{y}_i$ = povprečje signalov na i-tem koncentracijskem nivoju;

y_{im} = opazovani signal na i-tem koncentracijskem nivoju.

- **F-test za primerjavo standardnih odklonov dveh skupin meritev**

Velikokrat moramo primerjati slučajno napako dveh skupin meritev, pri čemer je prva skupina analiz, dobljenih z eno metodo, druga skupina meritev pa rezultat analiz, dobljenih z drugačno metodo (Bohanec, 1998). Če je s_1 standardni odmik prve skupine in s_2 standardni odklon druge skupine in je v prvi n_1 , v drugi pa n_2 meritev, potem izračunamo razmerje varainc obeh skupin po enačbi 7.

$$F_{\text{izrač}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \dots (7)$$

V primeru, da je $F_{\text{izrač}} > F_{\text{tabelarični}}$, se metodi razlikujeta po natančnosti pri 0,05 nivoju signifikantnosti. Opisani F-test uporabimo, kadarkoli imamo dve skupini meritev, ki se med seboj razlikujeta glede na različne vzorce in drugo. Ključno vprašanje je, ali sta metodi enako natančni ali ne. Ta test je eden najpogostejše uporabljenih testov, kadar primerjamo natančnost dveh skupin meritev torej analitikov, metod, priprav vzorca (Bohanec, 1998).

- **t-test za primerjavo povprečij dveh skupin meritev**

Imamo dve skupini meritev, ki imata standardni odklik s_1 (prva skupina meritev) in s_2 (druga skupina meritev), v prvi je n_1 , v drugi pa n_2 meritev. Na voljo imamo dva t-testa, in sicer enega, če sta standardna odklika obeh skupin meritev primerljiva, ter drugega, če sta standardna odklika obeh skupin meritve različna (Bohanec, 1998). Standardna odklika obeh skupin meritev najprej med seboj primerjamo z F-testom in se, glede na rezultat primerjave, nato odločimo za možnost:

a) Standardna odklika obeh skupin meritev sta primerljiva

V primeru, da sta standardna odklika obeh skupin primerljiva, uporabimo enačbi 8 in 9.

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \dots (8)$$

$$t_{\text{izrač}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \dots (9)$$

Povprečji obeh skupin meritev se razlikujeta, če velja $t_{\text{izrač}} > t_{\text{tabelarični}}$ (0,05, PS). Tabelarično t-vrednost odčitamo iz tabele. Pri primerjavi upoštevamo absolutno vrednost $t_{\text{izrač}}$.

b) Standardna odklika obeh skupin meritev sta različna

V primeru, da sta standardna odklika obeh skupin različna, pa uporabimo enačbi 10 in 11.

$$PS = \left[\frac{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}} \right] - 2 \quad \dots (10)$$

$$t_{izrač} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \dots (11)$$

Povprečji obeh skupin meritev se razlikujeta, če velja $t_{izrač} > t_{tabelarni}$ (0,05, PS). Tabelarno t-vrednost odčitamo iz tabele. Pri primerjavi upoštevamo absolutno vrednost $t_{izrač}$.

3 MATERIAL IN METODE

V različnih vzorcih ričkovega olja smo določali štiri različne sterole: brasikasterol, kampesterol, stigmasterol in β -sitosterol. Sterole smo določali s plinsko kromatografijo (FID detektor). V preglednici 5 so predstavljeni vzorci, ki smo jih analizirali.

3.1 MATERIALI

Analizirani vzorci slovenskega porekla se razlikujejo po letniku, vendar so bili analizirani tudi vzorci drugih držav. Podatki vseh analiziranih vzorcev so zbrani v preglednici 5.

Preglednica 5: Opis vzorcev ričkovega olja.

število vzorcev	poreklo	letnik
10	Slovenija (SLO)	2007
7	Slovenija (SLO)	2008
8	Slovenija (SLO)	2009
1	Avstrija (A)	2006
1	Finska (FIN)	2006
1	Združene države Amerike (USA)	2007
1	Nemčija (GER)	2008

Vzorci so identični vzorcem v doktorski disertaciji Roberta Hrastarja (2011), kjer pa so določene tudi druge lastnosti posameznih vzorcev. Vzorci so bili nabrani v obliki semen navadnega rička na Koroškem in po omenjenih dražavah po svetu (preglednica 5) ter stisnjeni v laboratoriju na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Nato so bili do analize zamrznjeni na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred analizo olja smo jih odmrznili in pred tehtanjem dobro premešali.

3.2 METODA IN PRINCIP DELA

Abidi (2001) navaja GC metodo kot bolj analitično natančno in občutljivo v primerjavi s HPLC. Pri tem pa je občutljivost odvisna od strukture sterolov in detektorjev, ki so sklopljeni s kromatografsko napravo. Zato smo se v naši raziskavi odločili, da uporabimo GC-analizo sterolov v ričkovem olju.

Najpogosteje se za analizo posameznih sterolov vključi hidrolizo lipidov, saponifikacijo ali kislinsko hidrolizo, saponifikacijo za sprostitve sterolov, ekstrakcijo neumljivih snovi in ločitev (delno čiščenje sterolov s TLC ali SPE), oblikovanje dobljenih sterolov ter njihova analiza na GC koloni (Lagarda in sod., 2006). Mi smo za analizo sterolov opravili saponifikacijo za sprostitve sterolov in trdno-fazno ekstrakcijo za ločitev sterolov iz vzorca, njihovo analizo pa smo opravili na GC koloni.

3.2.1 Reagenti in materiali

Kemikalije:

- etanol (C_2H_6O), Sigma-Aldrich, $\geq 99,8 \%$;
- destilirana voda, SIST EN ISO 3696 (1998);
- kalijev hidroksid (KOH), Riedel-de Haën;
- betulin (interni standard) ($C_{30}H_{50}O_2$), Sigma-Aldrich, $\geq 97,5 \%$;
- kloroform ($CHCl_3$), Sigma-Aldrich, 99,0–99,4 %;
- metanol (CH_4O), Sigma -Aldrich, $\geq 99,9 \%$;
- stigmasterol (standard) ($C_{29}H_{48}O$), Sigma-Aldrich, 95 %;
- campesterol (standard) ($C_{28}H_{48}O$), Sigma-Aldrich, 65 %;
- brassicasterol (standard) ($C_{28}H_{46}O$), Sigma-Aldrich, 98 %;
- β -sitosterol (standard) ($C_{29}H_{50}O$), Sigma-Aldrich, $\geq 90 \%$.

Laboratorijski materiali:

- Reagenčna steklenica (100 mL, 500 mL), Schott Duran, približni volumen;
- merilni valj (100 mL, 1000 mL), Isolab, ± 1 mL;
- čaše (50 mL, 100 mL), Simax, približni volumen;
- injekcijske brizge (5 mL), HS;
- teflonski filter (PTFE); premera 0,25 mm; velikost por je 0,45 μ m;

- polnilne pipete (100 μ L, 1 mL, 5 mL, 10 mL), Thermo Scientific;
- epruvete z obrusom $\sim$ 200 mL, VegaM
- viala s pokrovčki;
- tube za ekstrakcijo (Strata C18-E; 55 μ m, 70 Å).

Oprema:

- grelna kopel, Büchi Heating Bath B-490;
- magnetno mešalo, Lab dancer;
- rotavapor, Büchi Heating Bath B-490;
- GC-sistem Agilent, 6890 Series, s FID detektorjem;
- GC-kolona, HP-5 GC.

3.2.2 Postopek

Priprava raztopin

- 0,5 M KOH v etanolu

To raztopino smo pripravili tako, da smo zatehtali 14,028 g KOH v 0,5 L bučko in jo z etanolom dopolnili do oznake ter dobro premešali, da se je ves KOH raztopil. Tako smo pripravili raztopino in jo ves čas med analizami hranili v hladilniku na 4 °C.

- 0,22 mg betulina/mL kloroforma

To raztopino smo pripravili tako, da smo glede na število vzorcev preračunali, koliko mL kloroforma potrebujemo, nato pa smo s številom mL kloroforma pomnožili maso betulina ter tako dobili maso betulina, ki ga potrebujemo. Tako smo pripravili raztopino in jo ves čas med analizami hranili v hladilniku na 4 °C.

- 5 % metanola v kloroformu (v/v)

V 100 mL bučko smo nalili 5 mL metanola in s kloroformom dopolnili do oznake. Takšne raztopine smo pripravljali tedensko in jih med analizami hranili v hladilniku na 4 °C.

Priprava standardov

Standarde smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Vse standarde smo pripravili v raztopini za uporabo na GC. Ker so standardi različni, smo za vsak sterol pripravili standard drugačne koncentracije, kar je prikazano v preglednici 6. V našem primeru standardi nimajo enakih koncentracij (če bi jih imeli, bi bilo bolj pregledno), ker so na voljo nekateri standardi v manjših količinah (na primer kampesterol je na voljo v miligramskem pakiranju), druge standarde (ki so pakirani v večjih količinah) pa smo pri večji masi lahko natehtali bolj natančno. Tiste standarde, ki so pakirani v manjši količini (1 mg in 5 mg), smo porabili v celoti, da ni prišlo do napak pri tehtanju. To je razlog za različne koncentracije standardov. Raztopine smo pripravili tako, da smo določeno maso standarda zmešali z določeno količino topila (5 % metanola v kloroformu).

Preglednica 6: Pripravljeni standardi sterolov in njihove koncentracije.

STEROL	količina standarda	količina topila	koncentracija
kampesterol	1 mg	1 mL	1 mg/mL
β-sitosterol	5 mg	1 mL	5 mg/mL
stigmasterol	10 mg	1 mL	10 mg/mL
brasikasterol	5 mg	1 mL	5 mg/mL

Standarde in vzorce smo analizirali z GC, pri pogojih, ki so zapisani v preglednici 7 in 8.

Priprava vzorca

Odtehtamo 0,74 g ričkovega olja in dodamo 10 mL 0,5 M KOH v etanolu (s tem opravimo saponifikacijo). Vse skupaj dobro premešamo in segrevamo 20 minut na 77 °C. Nato ohladimo in dodamo 10 mL 0,22 mg/mL betulina (interni standard) v kloroformu in mešamo 5 minut. Pustimo, da se usedlina posede, tekočo fazo pa zberemo (najbolje s pipeto) v drugi čaši. Nato filtriramo 3 mL alikvota preko phenex 30 mm 0,45 μm teflonskim filtrom. Filtrat zbiramo v čaši in nato pričnemo s trdno-fazno ekstrakcijo s tubami (cartridges) condition strata C 18-E-SPE (55 μm, 70A) (slika 6), ki jo najprej speremo s 5 mL metanola in nato s 5 mL kloroforma. Nato dodamo 1 mL vzorca in ves čas pazimo, da se tube ne izsušijo (to pomeni, da so ves čas navlažene). Ko skozi tube steče

vzorec, zamenjamo posode, kamor so tekla topila in dodamo nove (epruvetke z obrusom, ki jih lahko uporabimo na napravi rotavapor) ter izperemo sterole iz tube s 15 mL 5 % metanola v kloroformu. Zbran ekstrakt sterolov (15 mL) v tej epruveti damo na rotovapor in pri tem segrevamo na 35 °C, da odparimo vso topilo. Dodamo 1 ml topila (5 % metanola v kloroformu), dobro premešamo in prenesemo 1 mL koncentrata v vijalo, ki gre v analizo na GC pri pogojih, ki so opisani v preglednici 8.



Slika 6: Tube Condition strata C 18-E-SPE.

Plinska kromatografija

Primerjali smo retenzijske čase standardov in vzorca ter ugotovili, pri katerem t_r se prikaže pik standarda in v tem času v vzorcu upoštevali površino pika. Dobili smo koncentracijo posameznega sterola v 1 mL analiziranega vzorca, da pa smo dobili podatek v g/100 g, smo morali upoštevati nadaljni izračun (enačba 11). GC je bila opravljena s kolono, ki je opisana v preglednici 7 in pod pogoji, ki so opisani v preglednici 8.

Preglednica 7: Opis uporabljene kolone na GC.

znamka kolone	J & W Scientific
ime kolone	HP-5 GC
stacionarna faza	(5 %-fenil)-metilpolisiloksan, 95 % dimetil polisiloksan
dolžina kolone	30 m
premer kolone	0,32 mm
film kolone	0,25 µm
temperaturne omejitve kolone	– 60 °C do 325 °C (350 °C)

Preglednica 8: Pogoji na GC napravi.

temperaturni profil	1 min. pri 220 °C
	220 °C–350 °C pri 15 °C/min.
	6 min. pri 350 °C
plin (mobilna faza)	konstantni pretok helija
pretok	1 mL/min
volumen vzorca	2 µL
temperatura injektorja	320 °C
temperatura detektorja	300 °C
split razmerje	ga ni

Ko smo standarde pod pogoji, ki so opisani v preglednici 7 in 8, dali na GC napravo, smo dobili njihove retenzijske čase, na podlagi katerih smo lahko potem v vzorcih identificirali posamezne sterole.

3.2.3 Izračun

Koncentracijo posameznih sterolov smo določili po enačbi 11.

$$W = \frac{A1 \times c \times M1}{A2 \times M2 \times m} \quad \dots (11)$$

A1 = površina pika sterola v vzorcu;

c = koncentracija betulina;

M1 = molska masa sterola;

A2 = površina pika betulina;

M2 = molska masa betulina;

m = masa vzorca v g;

W = koncentracija v g/100 g.

Pri dodatnih izračunih (za validacijo metode), pa nam je pomagal literaturni podatek, da ima ričkovo olje gostoto (pri 20 °C) 0,92 g/mL (Abramovič in Abram, 2005). Le-to nam je pomagalo, da smo lahko preračunali rezultate, ki so bili podani na 100 g, tako da smo jih lahko preračunali na 100 mL. To smo računali na način, da smo iz podatka gostote dobili nov podatek, da je 100 g olja enako 108,7 mL ričkovega olja. Pri podajanju rezultatov vzorcev olja navadnega rička pa smo za lažjo primerjavo rezultate podali v enoti mg/100 g.

4 REZULTATI

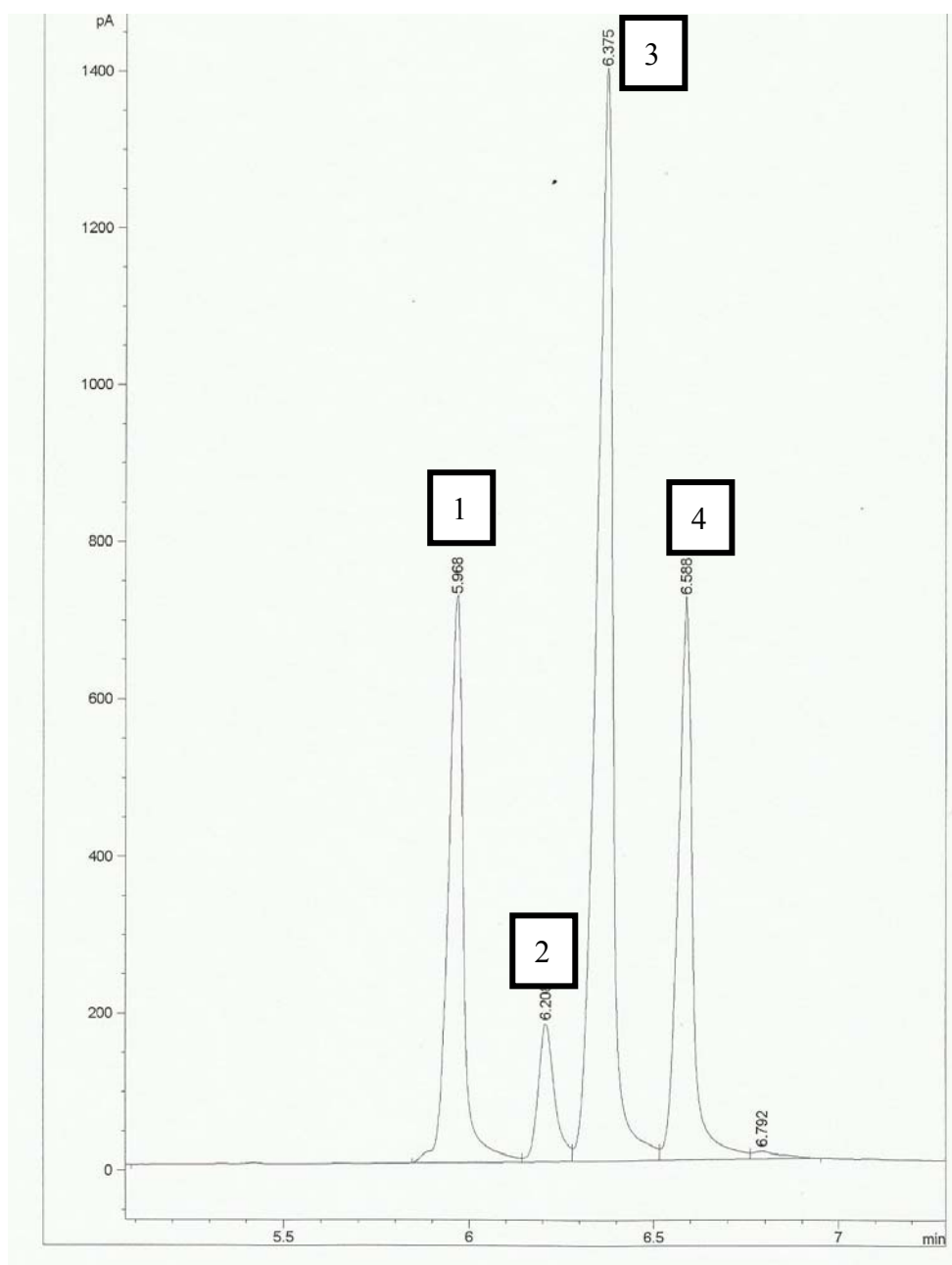
4.1 VALIDACIJA POSTOPKA ANALIZE DOLOČANJA STEROLOV V RIČKOVEM OLJU

Pred analizami vzorcev smo opravili validacijo metode. Tako smo najprej določili ponovljivost in obnovljivost metode.

V prvem delu eksperimenta smo poskušali optimizirati pogoje in najti prave pogoje priprave vzorca ter pogoje na GC-sistemu. Tako smo na GC-sistemu najprej analizirali posamezne standarde sterolov, da smo dobili kot rezultat t_r vsakega posameznega standarda. Nato smo naredili zmes standardov ter videli, ali se ujemajo t_r vsakega posameznega standarda. Takšen kromatogram smo kasneje pričakovali tudi v vzorcu.

Specifičnost in selektivnost

Ker se standardi med sabo dobro ločijo, je metoda specifična in selektivna, kar se lepo vidi na sliki 7 in v preglednici 9.

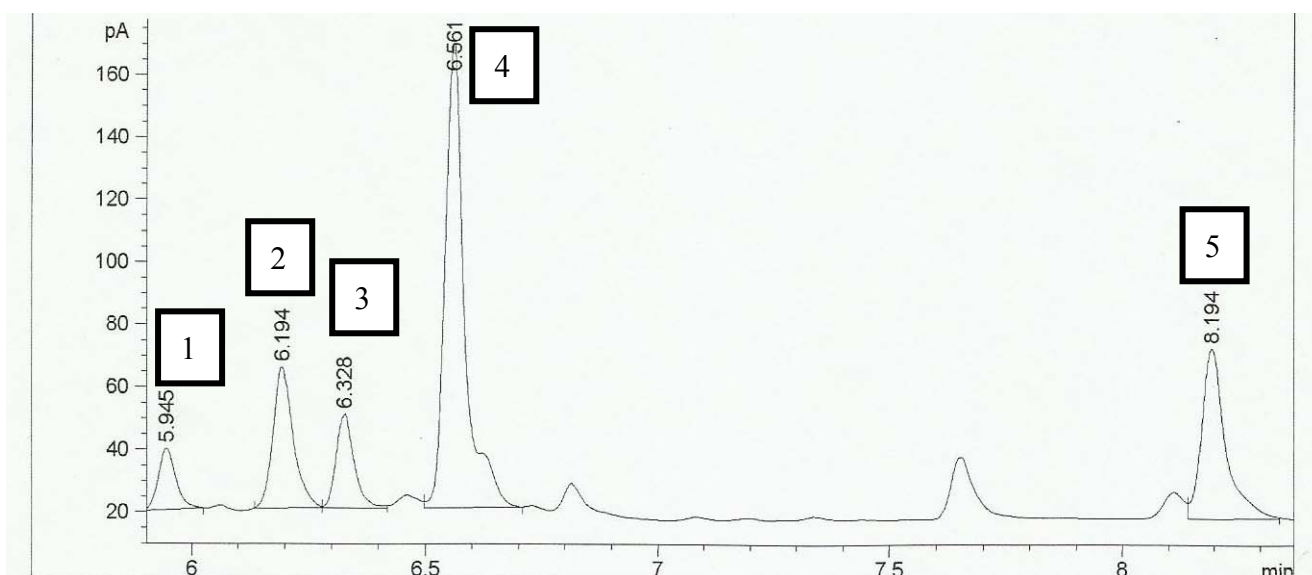


Slika 7: Kromatogram vseh standardov skupaj (1 – brasikasterol; 2 – kampesterol; 3 – stigmasterol; 4 – β -sitosterol).

Preglednica 9: Retenzijski časi (t_r) standardov.

sterol	t_r (min)	oznaka na sliki 10 in 11
brasikasterol	6,03	1
kampesterol	6,23	2
stigmasterol	6,33	3
β -sitosterol	6,65	4
interni standard (betulin)	8,19	5

Pred začetkom analize vzorcev smo najprej poskusili naključni vzorec, da smo videli, kako se vrhovi v kromatogramu ločijo v konkretnem vzorcu in dobili sliko 8.



Slika 8: Kromatogram vzorca ričkovega olja št. 6 (1 – brasikasterol; 2 – kampesterol; 3 – stigmasterol; 4 – β -sitosterol).

4.1.1 Ponovljivost in obnovljivost metode

Za določitev ponovljivosti in obnovljivosti metode smo dva dni zaporedoma opravili šest meritev na istem (naključnem) vzorcu ričkovega olja.

4.1.1.1 Brasikasterol

Rezultati meritev za brasikasterol v dveh dneh so prikazani v preglednicah 10 in 11. Iz preglednic je razvidno, da so si rezultati med seboj zelo podobni, natančnejše podatke pa dobimo s statistično obdelavo podatkov, katere rezultati so prikazani v preglednicah 12 in 13.

Preglednica 10: Koncentracije brasikasterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan).

št. vzorca	koncentracija brasikasterola (mg/100 g)
1	17,13
2	17,20
3	18,56
4	18,83
5	18,91
6	19,01

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{izrač}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 11: Koncentracije brasikasterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan).

št. vzorca	koncentracija brasikasterola (mg/100 g)
1	17,84
2	17,98
3	18,22
4	18,99
5	19,83
6	19,98

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{izrač}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 12: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za brasikasterol.

meritve	število meritev	povprečna koncentracija (mg/100 g)	standardni odklon (mg/100 g)	$F_{izrač}$	F_{tab}
1. dan	6	18,27	0,9	0,861	5,820
2. dan	6	18,81	0,9		

Ker je $F_{izrač}$ manjši od F_{tab} velja, da se metodi ne razlikujeta po natančnosti.

Preglednica 13: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za brasikasterol.

t_{tab}	$t_{izrač}$	pomen rezultata
2,23	-1,02	Med skupinama meritev ni signifikatnih razlik.

Ko smo pri t-testu primerjali povprečji obeh skupin meritev, je bilo razvidno, da je izračunani t manjši od tabelaričnega, zato lahko rečemo, da med meritvami v prvem in meritvami v drugem dnevu ni signifikatnih razlik. Zato smo izračunali skupno povprečje in

ga okarakterizirali kot obnovljivost metode s standardni odklonom ter relativnim standardnim odklonom, ki sta podana v preglednici 26.

4.1.1.2 Kampesterol

Rezultati meritev za kampesterol v 2 dneh so prikazani v preglednicah 14 in 15. Iz preglednic je razvidno, da so si rezultati med seboj zelo podobni, natančnejše podatke pa dobimo s statistično obdelavo podatkov, katere rezultati so prikazani v preglednicah 16 in 17.

Preglednica 14: Koncentracije kempesterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan).

št. vzorca	koncentracija kampesterola (mg/100 g)
1	160,31
2	166,23
3	171,70
4	178,22
5	183,01
6	191,87

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{izrač}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 15: Koncentracije kampesterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan).

št. vzorca	koncentracija kampesterola (mg/100 g)
1	169,19
2	170,04
3	170,68
4	179,56
5	189,90
6	199,32

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{izrač}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 16: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za kampesterol.

meritve	število meritev	povprečna koncentracija (mg/100 g)	standardni odklon (mg/100 g)	$F_{izrač}$	F_{tab}
1.skupina	6	175,22	11,51	0,849	5,820
2. skupina	6	179,78	12,44		

Ker je $F_{izrač}$ manjši od F_{tab} velja, da se metodi ne razlikujeta po natančnosti.

Preglednica 17: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za kampesterol.

$t_{tabelarni}$	$t_{izrač}$	pomen rezultata
2,23	-0,66	Med skupinama meritev ni signifikatnih razlik.

Ko smo pri t-testu primerjali povprečji obeh skupin meritev, je bilo razvidno, da je izračunani t manjši od tabelarnega, zato lahko rečemo, da med meritvami prvega in meritvami drugega dneva ni signifikatnih razlik. Zato smo izračunali skupno povprečje in ga okarakterizirali kot obnovljivost metode s standardnim odklonom ter relativnim standardnim odklonom, ki sta podana v preglednici 26.

4.1.1.3 Stigmasterol

Rezultati meritev za stigmasterol so prikazani v preglednicah 18 in 19. Iz preglednic je razvidno, da so si rezultati med sabo zelo podobni, natančnejše podatke pa dobimo s statistično obdelavo podatkov, katere rezultati so prikazani v preglednicah 20 in 21.

Preglednica 18: Koncentracije stigmasterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan).

št. vzorca	koncentracija stigmasterola (mg/100 g)
1	2,72
2	3,56
3	4,30
4	6,93
5	7,43
6	7,48

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{\text{izrač}}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 19: Koncentracije stigmasterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan).

št. vzorca	koncentracija stigmasterola (mg/100 g)
1	1,95
2	3,23
3	3,84
4	5,28
5	5,92
6	8,69

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{\text{izrač}}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 20: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za stigmasterol.

meritve	število meritev	povprečna koncentracija (mg/100 g)	standardni odklon (mg/100 g)	$F_{\text{izrač}}$	F_{tab}
1.skupina	6	5,54	2,1	0,802	5,820
2. skupina	6	4,82	2,4		

Ker je $F_{\text{izrač}}$ manjši od F_{tab} velja, da se metodi ne razlikujeta po natančnosti.

Preglednica 21: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za stigmasterol.

t_{tab}	$t_{\text{izrač}}$	pomen rezultata
2,23	-0,45	Med skupinama meritev ni signifikantnih razlik.

Ko smo pri t-testu primerjali povprečji obeh skupin meritev, je bilo razvidno, da je izračunani t manjši od tabelarnega (gledamo absolutno vrednost), zato lahko rečemo, da med meritvami prvega in meritvami drugega dne ni signifikantnih razlik. Zato smo izračunali skupno povprečje in ga okarakterizirali kot obnovljivost metode s standardnim odklonom ter relativnim standardnim odklonom, ki sta podana v preglednici 26.

4.1.1.4 β -sitosterol

Rezultati meritev za β -sitosterol so prikazani v preglednicah 22 in 23. Iz preglednic je razvidno, da so si rezultati med seboj zelo podobni, natančnejše podatke pa dobimo s statistično obdelavo podatkov, katere rezultati so prikazani v preglednicah 24 in 25.

Preglednica 22: Koncentracije β -sitosterola za določitev ponovljivosti (meritve 1. dan).

št. vzorca	koncentracija β -sitosterola (mg/100 g)
1	457,00
2	460,12
3	510,04
4	510,06
5	530,91
6	542,05

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri vseh zunajležečih meritvah $Q_{\text{izrač}}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 23: Koncentracije β -sitosterola za določitev obnovljivosti (meritve 2. dan).

št. vzorca	koncentracija β -sitosterola (mg/100 g)
1	515,01
2	516,34
3	527,06
4	540,00
5	569,86
6	574,15

Dixonov Q-test za ugotavljanje ubežnikov nam je pokazal, da nobena meritev ni ubežnik, saj je pri obeh zunajležečih meritvah $Q_{\text{izrač}}$ manjši od Q_{tab} .

Preglednica 24: Rezultati F-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za β -sitosterol.

meritve	število meritev	povprečna koncentracija (mg/100 g)	standardni odklon (mg/100 g)	$F_{izrač}$	F_{tab}
1.skupina	6	501,70	35,6	1,862	5,820
2. skupina	6	540,40	26,1		

Ker je $F_{izrač}$ manjši od F_{tab} velja, da se metodi ne razlikujeta po natančnosti.

Preglednica 25: Rezultati t-testa pri meritvah za 1. in 2. dan za β -sitosterol.

t_{tab}	$t_{izrač}$	pomen rezultata
2,23	-2,15	Med skupinama meritev ni signifikantnih razlik.

Ko smo pri t-testu primerjali povprečji obeh skupin meritev, je bilo razvidno, da je izračunani t manjši od tabelarnega, zato lahko rečemo, da med meritvami prvega in meritvami drugega dne ni signifikantnih razlik. Zato smo izračunali skupno povprečje in ga okarakterizirali kot obnovljivost metode s standardnim odklonom ter relativnim standardnim odklonom, ki sta podana v preglednici 26.

Preglednica 26: Skupno povprečje, standardni odklon in relativni standardni odklon za brasikasterol, kampesterol, β -sitosterol in stigmasterol.

sterol	število meritev	povprečje ($\bar{x}$) (mg/100 g)	standardni odklon (s_x) (mg/100 g)	relativni standardni odklon (RSD) (%)
brasikasterol	12	18,54	0,9	4,9
kampesterol	12	177,50	11,2	6,6
β -sitosterol	12	521,05	36,5	6,9
stigmasterol	12	5,11	2,1	42,5

4.1.2 Standardni dodatek (Recovery)

Pravilnost rezultata smo preverili tako, da smo analizirali naključni vzorec (oznaka V), ki smo mu dodali točno znano količino vseh standardov sterolov v vzorec pripravljen za GC analizo (oznaka VM) in pa isti vzorec, ki smo mu enako količino vseh standardov dodali pred pripravo vzorca (oznaka VR). Vzorec z oznako VM je bil namenjen preverjanju pravilnosti rezultata (recovery) na plinskem kromatografu, medtem ko je bil vzorec VR namenjen preverjanju poteka celotne analize (priprave vzorca) in GC določitve. Rezultati so podatni v preglednici 27.

Preglednica 27: Določene koncentracije posameznih sterolov v vzorcih V, VM in VR (mg/100 g).

ime vzorca	koncentracija sterolov (mg/100 g)			
	brasikasterol	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol
V	24,13	159,16	5,742	516,12
VM	43,96	175,90	79,74	581,34
VR	36,22	191,64	78,75	524,17

Preglednici 28 in 29 prikazujeta pravilnost dobljenih rezultatov pri standardnem dodatku, zaradi lažjega razumevanja pa so tukaj podatki namesto v enotah mg/100 g, v enotah mg/100 mL.

Preglednica 28: Pravilnost rezultatov, če vzorcu dodamo standarde sterolov v vzorec pred pripravo vzorca v mg/100 mL.

ime vzorca	koncentracija sterolov (mg/100 mL)			
	brasikasterol	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol
V	22,20	146,43	5,03	474,86
VR (praktični)	33,32	134,72	73,37	482,26
VR (teoretični)	38,87	149,77	86,24	491,53
pravilnost rezultata (%)	85, 72	89,95	85,08	98,11

Kadar dodajamo standardni dodatek sterolov pred pripravo vzorca, preverjamo kako potek priprave vzorca in GC analiza vplivata na vzorec. Rezultati iz preglednice 28 kažejo, da metoda pri določitvi brasikasterola daje za 14,28 % manjši rezultat od pričakovanega, pri kampesterolu pa za 10,05 % manjši rezultat od pričakovanega. Pri določitvi stigmasterola daje metoda za 14,92 % manjši rezultat od pričakovanega, pri β -sitosterolu pa le za 1,89 % manjši rezultat od pričakovanega.

Preglednica 29: Pravilnost rezultatov, če vzorcu dodamo standarde sterolov po pripravi vzorca v mg/100 mL.

	koncentracija sterolov (mg/100 mL)			
ime vzorca	brasikasterol	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol
V	22,20	146,43	5,03	474,86
VM (praktični)	40,45	161,84	95,12	534,86
VM (teoretični)	38,87	149,77	86,24	491,53
pravilnost rezultata (%)	104,06	108,06	110,30	108,82

Kadar dodajamo standardni dodatek sterolov po opravljeni pripravi vzorca, pravzaprav preverjamo samo GC določitev. Rezultati preglednice 29 kažejo, da naprava GC pri določitvi brasikasterola pokaže za 4,06 % večji rezultat od teoretičnega, pri kampesterolu pa za 8,06 % manjši rezultat. Pri stigmasterolu pokaže naprava GC za 10,30 % manjši rezultat in pri β -sitosterolu za 8,82 % manjši rezultat od teoretičnega.

4.1.3 Linearnost

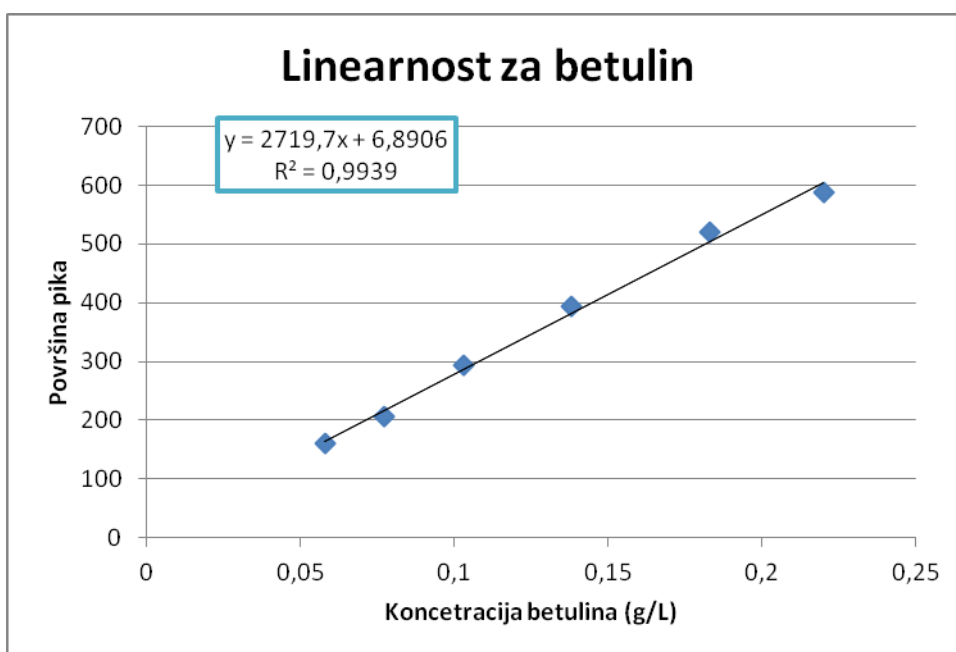
Glede na območje določitve vzorcev smo izračunali koncentracije standardov, kjer se je njihova koncentracija linearno povečevala. Tako smo določali, ali se tudi površina pikov pri GC določitvi linearno povečuje. Rezultati so razvidni v preglednicah 30–34 in na slikah 9–13, kjer je jasno prikazana tudi enačba linearne premice in R^2 za posamezni standard.

4.1.3.1 Betulin

V preglednici 30 in na sliki 9 so opisani ter prikazani rezultati meritev površin pikov na GC pri različnih koncentracijah standarda betulina za določitev linearnosti metode.

Preglednica 30: Rezultati meritev standardnih raztopin betulina za izračun linearnosti.

koncentracija betulina (g/L)	površina pika na GC
0,058	159,4
0,077	205,7
0,103	293,8
0,138	394,7
0,183	519,4
0,220	587,0



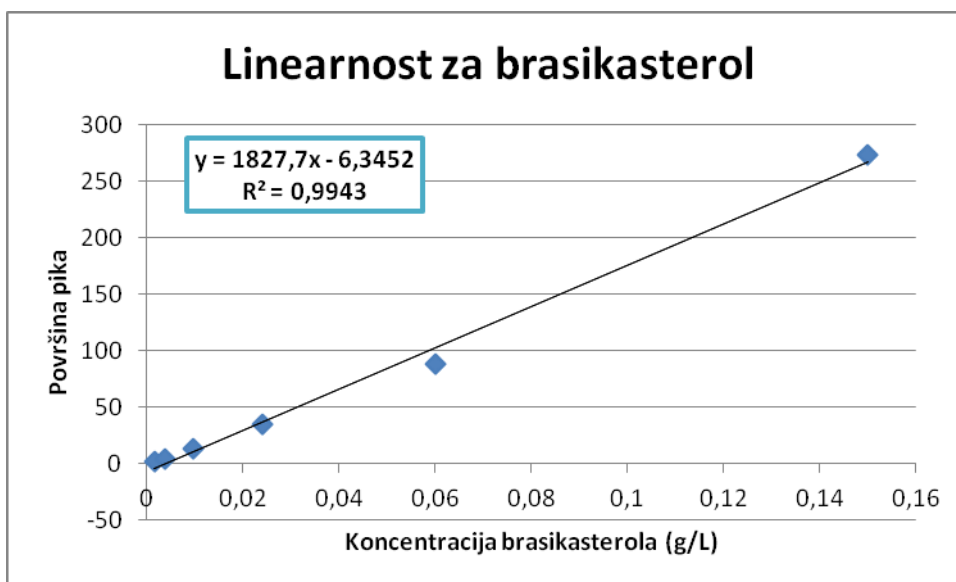
Slika 9: Graf linearnosti za interni standard (betulin) z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2 .

4.1.3.2 Brasikasterol

V preglednici 31 in na sliki 10 so opisani ter prikazani rezultati meritev površin pikov na GC pri različnih koncentracijah standarda brasikasterola za določitev linearnosti metode.

Preglednica 31: Rezultati meritev standardnih raztopin brasikasterola za izračun linearnosti.

koncetracija brasikasterola (g/L)	površina pika na GC
0,00154	1,9
0,00384	4,4
0,0096	13,2
0,024	35,3
0,06	88,3
0,15	273,9



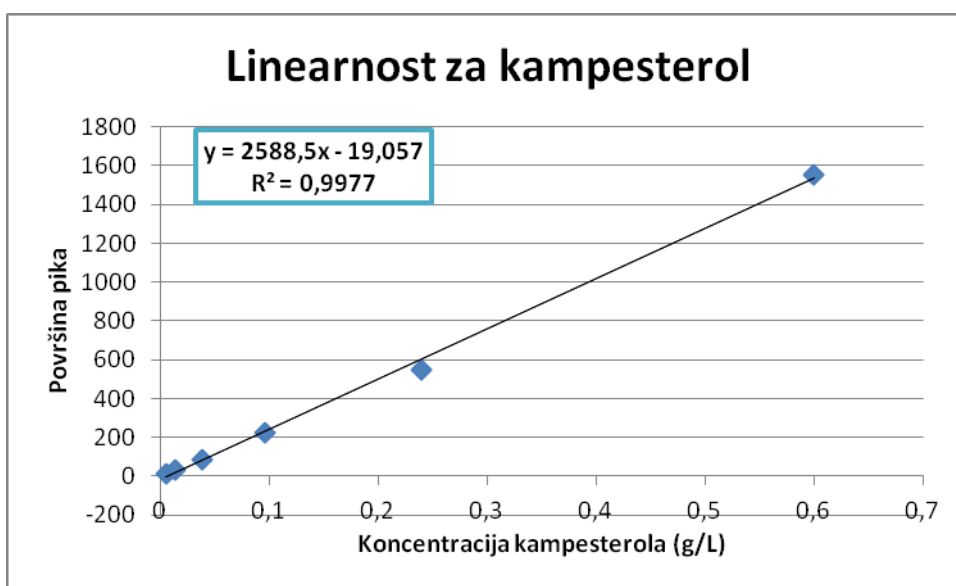
Slika 10: Graf linearnosti za brasikasterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2 .

4.1.3.3 Kampesterol

V preglednici 32 in na sliki 11 so opisani ter prikazani rezultati meritev površin pikov na GC pri različnih koncentracijah standarda kampesterola za določitev linearnosti metode.

Preglednica 32: Rezultati meritev standardnih raztopin kampesterola za izračun linearnosti.

koncetracija kampesterola (g/L)	površina pika na GC
0,00544	1555,9
0,0136	548,1
0,0384	223,3
0,096	83,9
0,24	33,4
0,6	12,5



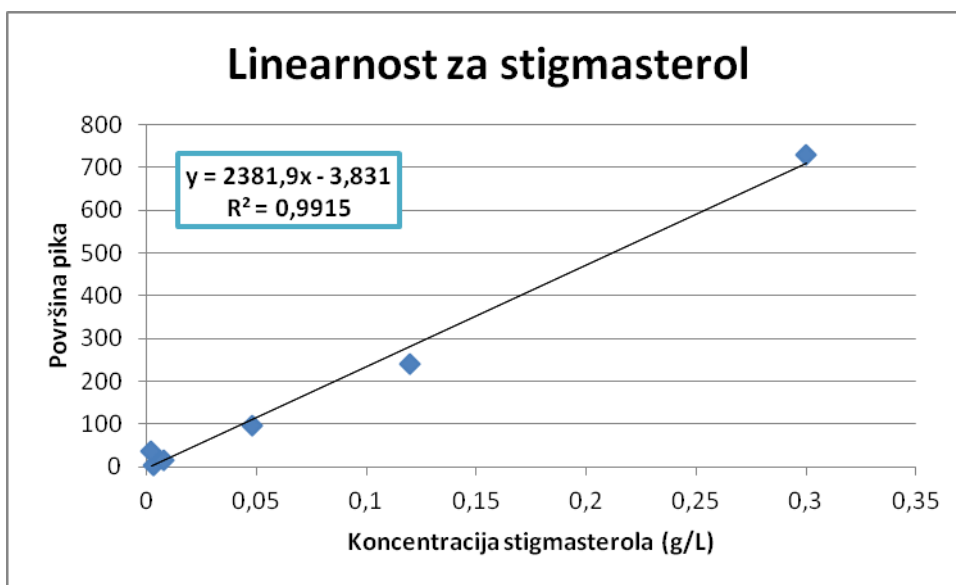
Slika 11: Graf linearnosti za kampesterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2 .

4.1.3.4 Stigmasterol

V preglednici 33 in na sliki 12 so opisani ter prikazani rezultati meritev površin pikov na GC pri različnih koncentracijah standarda stigmasterola za določitev linearnosti metode.

Preglednica 33: Rezultati meritev standardnih raztopin stigmasterola za izračun linearnosti.

koncentracija stigmasterola (g/L)	površina pika na GC
0,00307	3,8
0,00768	14,7
0,0192	35,8
0,048	96,8
0,12	242,2
0,3	728,6



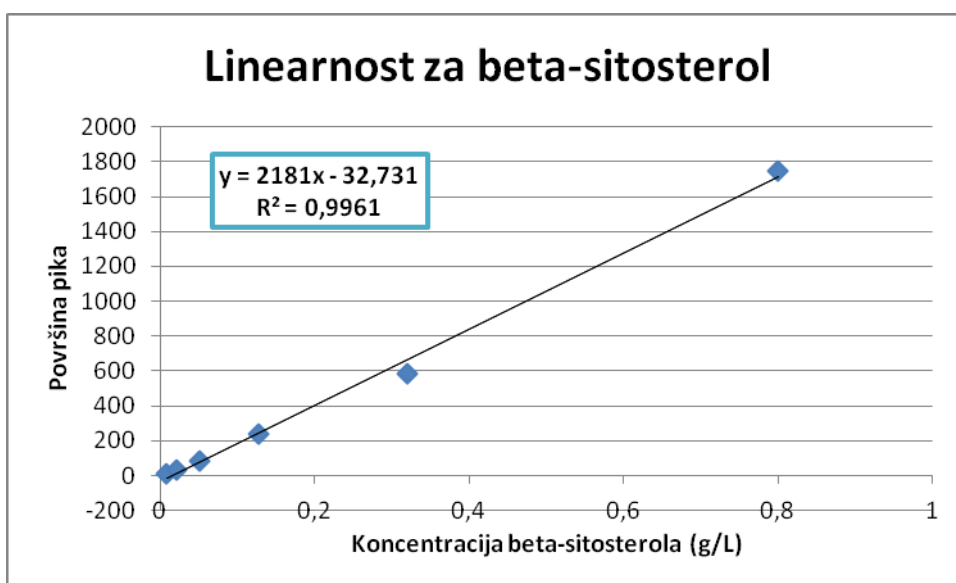
Slika 12: Graf linearnosti za stigmasterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2 .

4.1.3.5 β -sitosterol

V preglednici 34 in na sliki 13 so opisani ter prikazani rezultati meritev površin pikov na GC pri različnih koncentracijah standarda β -sitosterola za določitev linearnosti metode.

Preglednica 34: Rezultati meritev standardnih raztopin β -sitosterola za izračun linearnosti.

koncetracija β -sitosterola (g/mL)	površina pika na GC
0,0082	12,8
0,0205	34,1
0,0512	86,9
0,128	235,8
0,32	586,1
0,8	1744,0



Slika 13: Graf linearnosti za β -sitosterol z enačbo premice in korelacijskim koeficientom R^2 .

Ker nas zanima, ali je metoda linearna, lahko glede na vse grafe (iz slik 9–13) vidimo, da je R^2 večji od 0,99, kar glede na podatke v literature pomeni, da je metoda za vse omenjene sterole (brasikasterol, kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol) linearna. Prav tako je metoda

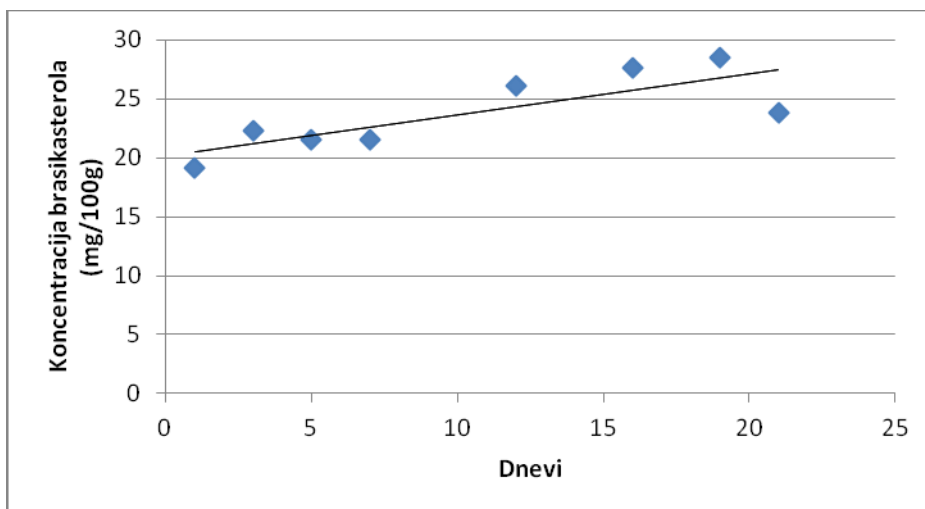
linearna tudi za interni standard-betulin, saj je R^2 večji od 0,99.

4.1.4 Stabilnost (obstojnost določenih sterolov v hladilniku kot analizirani vzorec)

Ob določitvi stabilnosti analiziranih vzorcev v hladilniku pri 4 °C smo prišli do rezultatov, ki so zapisani v preglednici 35 ter grafično prikazani na slikah 14–17. Za določitev ali je analizirani sterol v hladilniku obstojen, smo uporabili kriterij, kjer smo upoštevali odstopanje za vrednost standardnega odklona. Od tistega dne ko je koncentracija odstopala od prvega dne za večjo vrednost kot je standardni odklon, smo določili, da koncentracija tega sterola od tega dne v hladilniku ni več obstojna.

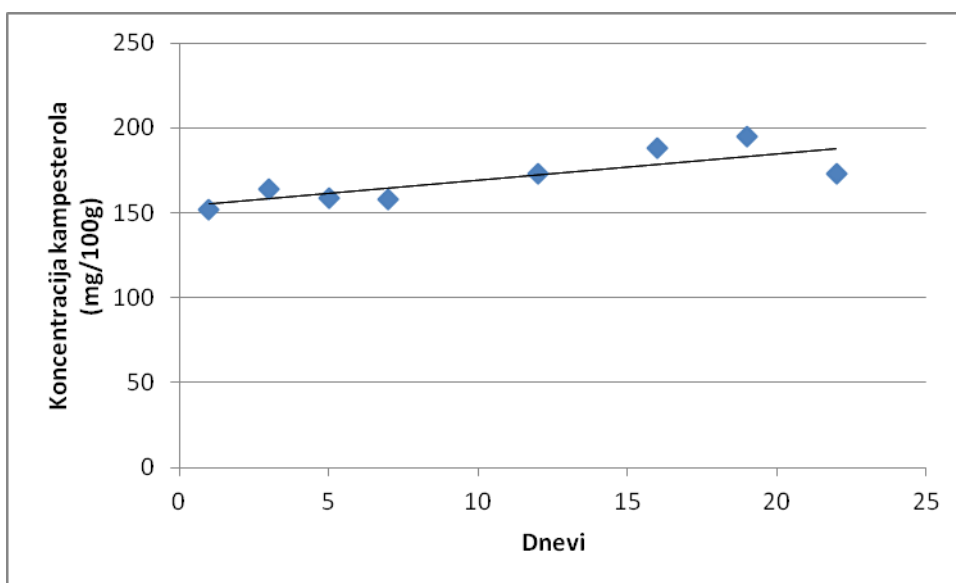
Preglednica 35: Obstojnost pripravljenih vzorcev ričkovega olja v hladilniku.

dan/sterol	Koncentracija sterolov (mg/ 100 g)			
	brasikasterol	kampesterol	stigmasterol	β -sitosterol
1. dan	19,17	152,11	4,14	460,06
3. dan	22,29	163,92	4,22	463,22
5. dan	21,58	158,62	4,37	465,44
7. dan	21,48	158,25	4,03	464,97
12. dan	26,08	173,04	4,37	459,90
16. dan	27,63	187,90	4,49	489,67
19. dan	28,53	195,22	3,81	509,95
21. dan	23,77	172,82	3,74	551,15



Slika 14: Odvisnost koncentracije brasikasterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.

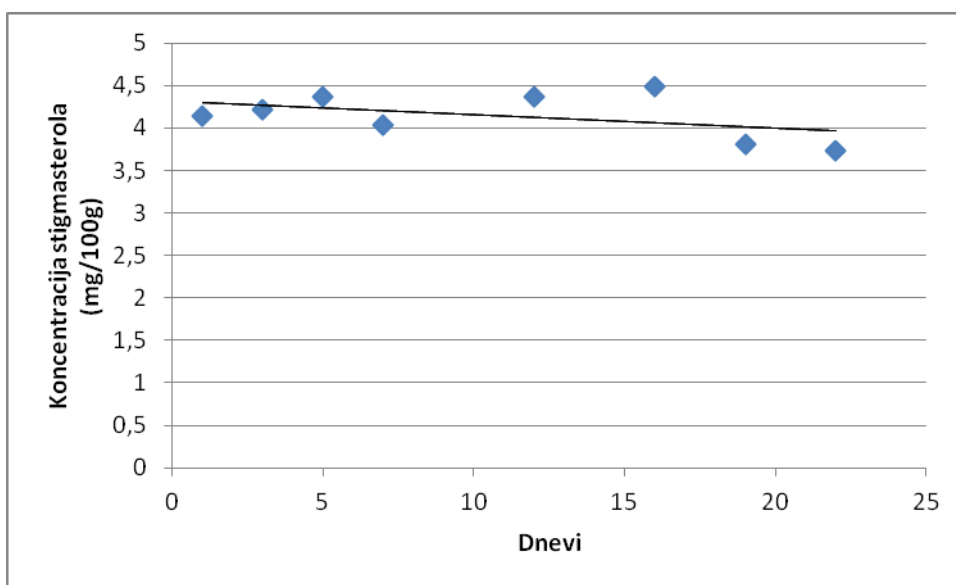
Koncentracija brasikasterola se med hranjenjem v hladilniku ne ohranja. Vedno je najbolje, da se analiza na GC opravi takoj po pripravi vzorca (tako smo analizirali sterole tudi mi). Pri spremljanju sterolov ugotovimo, da se količina brasikasterola rahlo povečuje. Temu bi lahko bil vzrok, da topilo (5 % metanola v kloroformu) rahlo hlapi skozi pokrovček na vijalah – le-ta je gumijast (vijale, ki jih uporabimo direktno na GC). Druga možnost za takšen rezultat je, da se v pripravljenih vzorcih prične dodatna razgradnja vezanih sterolov, le-ti pa dajejo večji rezultat na GC analizi. Glede na to, da je relativni standardni odklon pri ponovljivosti metode za brasikasterol 4,9 %, nekatere meritve tudi odstopajo za večjo vrednost, kot je standardni odklon ponovljivosti, je, kot rečeno, analizo GC najbolje opraviti takoj po pripravi vzorca, saj v splošnem koncentracija brasikasterola v hladilniku ni obstojna.



Slika 15: Odvisnost koncentracije kampesterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.

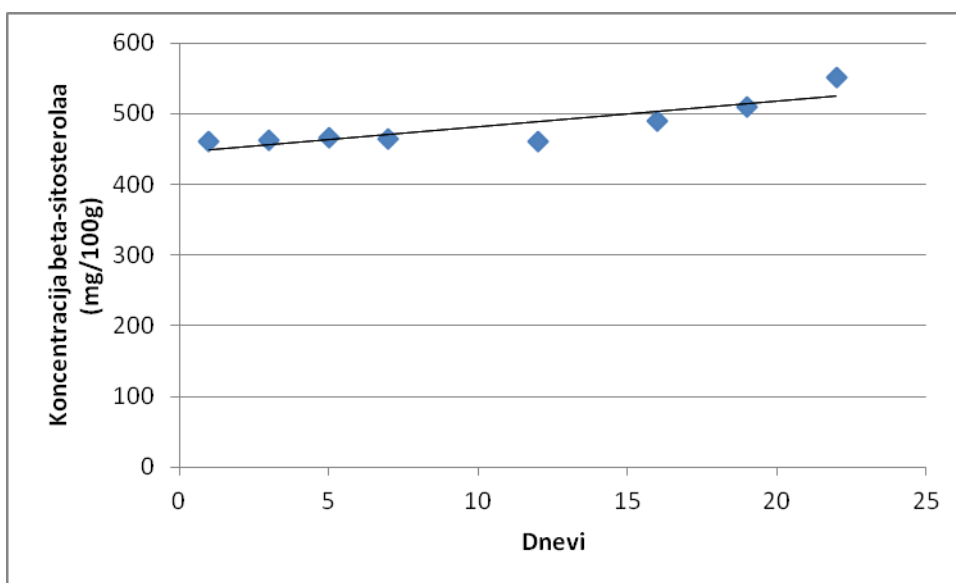
Koncentracija kampesterola se med hranjenjem v hladilniku prvi teden zelo dobro ohranja, saj so vse meritve v okviru relativnega standardnega odklona, in sicer 6,6 %. Po sedmem dnevu pa se koncentracija začne zopet malo povečevati in za to je verjetno podoben razlog

kot pri brasikasterolu – hlapenje topila ali dodatna razgradnja vezanih sterolov. V splošnem bi se kampesterol v hladilniku lahko hranil sedem dni brez nihanj koncentracije, kasneje pa te koncentracije pričnejo odstopati od standardnega odklona. Vseeno je analizo še vedno najboljše opraviti takoj po opravljeni pripravi vzorca.



Slika 16: Odvisnost koncentracije stigmasterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.

Pri spremljanju koncentracije stigmasterola med hranjenjem v hladilniku je iz grafa na sliki 16 razvidno, da se koncentracija omenjenega sterola ne spreminja veliko, med vsemi 21. dnevi se spreminja le v okviru relativnega standardnega odklona, to je 42,5 %. Zato lahko trdimo, da se stigmasterol ohranja v hladilniku najmanj tri tedne, vendar pa je kljub vsemu bolje narediti analizo GC takoj po pripravi vzorca za analizo.



Slika 17: Odvisnost koncentracije β -sitosterola v pripravljenem vzorcu ričkovega olja od časa hranjenja v hladilniku.

Koncentracija β -sitosterola se med hranjenjem v hladilniku ne ohranja, saj vse meritve odstopajo od meritve prvega dne in tudi od relativnega standardnega odklona izračunanega pri ponovljivosti (6,9 %). Zato moramo, kadar analiziramo β -sitosterol, analizo GC opraviti vedno takoj po pripravi vzorca.

Skupni rezultati ohranjanja sterolov v hladilniku pomenijo, da lahko v hladilniku najmanj tri tedne hranimo le stigmasterol, en teden pa kampesterol, medtem ko brasikasterol ter β -sitosterol nista obstojna. Kadar delamo omenjene sterole, je analizo GC vedno najboljše opraviti po pripravi vzorca.

4.2 STEROLI V RIČKOVEM OLJU

V preglednici 36 so zapisani vsi rezultati vzorcev vseh letnikov in držav, ki so bili analizirani.

Preglednica 36: Koncentracije sterolov v vzorcih ričkovga olja.

številka vzorca	poreklo	letnik	koncentracija sterolov (mg/100 g)			
			brasika- sterol	kampe- sterol	stigma- sterol	β-sito- sterol
1	SLO	2007	19,44	144,00	1,73	391,00
2	SLO	2007	31,44	220,40	14,23	555,00
3	SLO	2007	25,00	177,36	4,05	549,72
4	SLO	2007	19,52	162,00	2,09	547,09
5	SLO	2007	18,70	134,75	5,35	391,02
6	SLO	2007	22,55	178,03	6,93	526,33
7	SLO	2007	21,43	145,50	4,49	489,82
8	SLO	2007	34,47	199,41	1,89	525,10
9	SLO	2007	29,16	176,20	11,81	452,35
10	SLO	2007	24,13	159,40	3,73	516,61
11	SLO	2008	19,20	138,02	3,98	405,00
12	SLO	2008	16,79	151,85	4,28	412,47
13	SLO	2008	15,88	135,78	5,05	409,12
14	SLO	2008	21,58	140,83	6,62	405,69
15	SLO	2008	22,60	187,66	3,73	552,80
16	SLO	2008	37,00	246,01	1,55	622,01
17	SLO	2008	27,73	168,58	2,09	409,65
18	SLO	2009	26,55	176,38	5,28	448,75
19	SLO	2009	16,10	140,30	3,86	420,29
20	SLO	2009	20,13	153,20	5,62	472,53
21	SLO	2009	32,27	311,90	9,90	476,21
22	SLO	2009	17,86	121,80	2,53	342,92
23	SLO	2009	17,77	140,01	1,60	422,07
24	SLO	2009	19,23	147,79	1,40	423,86
25	SLO	2009	23,22	122,23	5,00	324,09
26	A	2006	20,39	122,96	4,81	333,60
27	FIN	2006	23,61	152,43	4,48	434,97
28	USA	2007	21,16	155,97	20,81	388,52
29	GER	2008	25,80	175,23	9,36	471,04

4.2.1 Primerjava slovenskih vzorcev z vzorci drugih držav

Iz preglednice 37 je razvidno, da zelo velikih razlik med vzorci po državah ni opaziti. Največja razlika je v koncentraciji stigmasterola v vzorcu iz Združenih držav Amerike v primerjavi z drugimi državami.

Preglednica 37: Koncentracije sterolov v vzorcih ričkovega olja drugih držav v primerjavi s povprečjem slovenskih.

številka vzorca	poreklo	letnik	koncentracija sterolov (mg/100 g)			
			brasika- sterol	kampe- sterol	stigma- sterol	β-sito- sterol
26	A	2006	20,39	122,96	4,81	333,60
27	FIN	2006	23,61	152,43	4,48	434,97
28	USA	2007	21,16	155,97	20,81	388,52
29	GER	2008	25,80	175,23	9,36	471,04
1-25	SLO	2007, 2008, 2009	23,13	165,03	5,46	452,40

4.2.2 Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za brasikasterol

Rezultati v preglednici 38 in rezultati F-testa (preglednica 39) kažejo, da imata letnika 2007 in 2008 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač.}}$. To pomeni, da se skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač.}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina brasikasterola v letih 2007 in 2008 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 38 : Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za brasikasterol
(letnik 2007, 2008, 2009).

LETNIK	n	$\bar{x}$ (mg/100 g)	$\pm s_x$ (mg/100 g)	min (mg/100 g)	max (mg/100 g)
2007	10	24,92	5,4	18,70	34,47
2008	7	23,74	7,4	15,88	37,00
2009	8	22,15	5,4	16,10	32,27

Preglednica 39: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (brasikasterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač.}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač.}}$
4,761	0,549	2,13	0,52

Rezultati v preglednici 38 in rezultati F-testa (preglednica 40) kažejo, da imata letnika 2007 in 2009 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač.}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač.}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina brasikasterola v letih 2007 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 40: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (brasikasterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,295	0,996	2,12	1,14

V splošnem se slovenski vzorci ričkovega olja v letih 2007, 2008 in 2009 med seboj ne razlikujejo po količini brasikasterola, kar sta pokazala F-test in t-test.

Rezultati v preglednici 38 in rezultati F-testa (preglednica 41) kažejo, da imata letnika 2008 in 2009 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina brasikasterola v letih 2008 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 41: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (brasikasterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,529	1,822	2,16	0,40

4.2.3 Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za kampesterol

Rezultati v preglednici 42 in rezultati F-testa (preglednica 43) kažejo, da imata letnika 2007 in 2008 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina kampesterola v letih 2007 in 2008 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 42: Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za kampesterol
(letnik 2007,2008, 2009).

LETNIK	n	$\bar{x}$ (mg/100 g)	$\pm s_x$ (mg/100 g)	min (mg/100 g)	max (mg/100 g)
2007	10	171,02	26,4	134,75	220,40
2008	7	172,28	39,6	135,78	246,01
2009	8	174,73	62,2	121,80	311,90

Preglednica 43: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (kampesterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,761	0,444	2,13	0,17

Rezultati (preglednica 42) in rezultati F-testa (preglednica 44) kažejo, da imata letnika 2007 in 2009 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina kampesterola v letih 2007 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 44: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (kampesterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,295	0,180	2,12	0,25

Rezultati v preglednici 42 in rezultati F-testa (preglednica 45) kažejo, da imata letnika 2008 in 2009 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina kampesterola v letih 2008 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 45: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (kampesterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,529	0,405	2,16	0,10

V splošnem se slovenski vzorci ričkovega olja v letih 2007, 2008 in 2009 med seboj ne razlikujejo po količini kampesterola, kar sta pokazala F-test in t-test.

4.2.4 Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za stigmasterol

Rezultati v preglednici 46 in rezultati F-testa (preglednica 47) kažejo, da imata letnika 2007 in 2008 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ manjši od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) v tem primeru razlikujeta po natančnosti. Ko primerjamo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina stigmasterola v letih 2007 in 2008 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 46: Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za stigmasterol
(letnik 2007,2008, 2009).

LETNIK	n	$\bar{x}$ (mg/100 g)	$\pm s_x$ (mg/100 g)	min (mg/100 g)	max (mg/100 g)
2007	10	6,02	4,3	1,73	14,23
2008	7	3,94	1,7	1,55	6,62
2009	8	5,19	2,3	2,53	9,90

Preglednica 47: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (stigmasterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,761	6,137	2,13	1,01

Rezultati v preglednici 46 in rezultati F-testa (preglednica 48) kažejo, da imata letnika 2007 in 2009 primerljiva standardna odklona in je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$

manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina stigmasterola v letih 2007 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 48: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (stigmasterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,295	3,521	2,12	0,41

Rezultati v preglednica 46 in rezultati F-testa (preglednica 49) kažejo, da imata letnika 2008 in 2009 primerljiva standardna odklona in je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko uporabimo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni signifikantnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina stigmasterola v letih 2008 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 49: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (stigmasterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,529	0,574	2,16	-0,99

V splošnem se slovenski vzorci ričkovega olja v letih 2007, 2008 in 2009 med seboj ne razlikujejo po količini stigmasterola, kar sta pokazala F-test in t-test, kljub temu da se je pokazala razlika v standardnih odklonih pri primerjavi letnikov 2007 in 2008.

4.2.5 Primerjava Slovenskih vzorcev po letniku za β -sitosterol

Rezultati v preglednici 50 in rezultati F-testa (preglednica 51) kažejo, da imata letnika 2007 in 2008 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ manjši od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) v tem primeru razlikujeta po natančnosti. Ko primerjamo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni signifikantnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina β -sitosterola v letih 2007 in 2008 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 50: Primerjava slovenskih vzorcev po letniku za β -sitosterol
(letnik 2007,2008, 2009).

LETNIK	n	$\bar{x}$ (mg/100 g)	$\pm s_x$ (mg/100 g)	min (mg/100 g)	max (mg/100 g)
2007	10	490,84	62,5	391,00	555,00
2008	7	471,52	89,6	405,00	622,01
2009	8	413,10	55,8	324,09	476,21

Preglednica 51: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2008 (β -sitosterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,761	0,486	2,13	0,95

Rezultati v preglednici 50 in rezultati F-testa (preglednica 52) kažejo, da imata letnika 2007 in 2009 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko primerjamo t-test, pa lahko ugotovimo, da so med letnikoma statistične razlike, saj je $t_{\text{izrač}}$ večji od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da količina β -sitosterola v letih 2007 in 2009 ni primerljiva, saj so večje razlike.

Preglednica 52: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2007 in 2009 (β -sitosterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,295	1,254	2,12	2,76

Rezultati v preglednici 50 in rezultati F-testa (preglednica 53) kažejo, da imata letnika 2008 in 2009 primerljiva standardna odklona in da je $F_{\text{teoretični}}$ večji od $F_{\text{izrač}}$. To pomeni, da se obe skupini meritev (ki se razlikujeta po letniku) ne razlikujeta po natančnosti. Ko primerjamo t-test, pa lahko ugotovimo, da med letnikoma ni statističnih razlik, saj je $t_{\text{izrač}}$ manjši od $t_{\text{teoretičnega}}$. Zato lahko rečemo, da je količina β -sitosterola v letih 2008 in 2009 primerljiva brez večjih razlik.

Preglednica 53: Rezultati t-testa in F-testa za letnik 2008 in 2009 (β -sitosterol).

$F_{\text{teoretični}}$	$F_{\text{izrač}}$	$t_{\text{teoretični}}$	$t_{\text{izrač}}$
4,529	2,581	2,16	1,14

V splošnem se slovenski vzorci ričkovega olja v letih 2007, 2008 in 2009 med seboj ne razlikujejo po količini β -sitosterola, kar sta pokazala F-test in t-test, kljub temu da se je pokazala razlika v rezultatih pri letniku 2007 in 2009, kjer so signifikantne razlike v količini.

4.3 VREMENSKI PODATKI ZA LETA 2007, 2008 IN 2009

Da bi preverili, ali temperatura, vlaga in količina padavin vplivajo na količino sterolov, smo za leta, v katerih smo uporabili seme navadnega rička, pridobili tudi vremenske podatke, ki jih je prispevala Državna meterološka služba Republike Slovenije. Upoštevali smo vreme v mesecih od marca do avgusta, saj so v tem času pridelovalci vzorcev olja sejali in želi navadni riček. Podatki za leto 2007 so zbrani v preglednici 54, 2008 v preglednici 55 in za leto 2009 v preglednici 56.

Preglednica 54: Podatki o vremenu za leto 2007 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).

mesec/parameter	povprečna temperatura (°C)	povprečna relativna vlaga (%)	količina padavin (mm)
marec	5,5	77	133,3
april	11,1	70	9,4
maj	15,2	73	113
junij	19	73	130,7
julij	19,6	67	172
avgust	17,8	79	240
SKUPAJ	14,70 ± 5,5	73,17 ± 4,4	798,4

Preglednica 55: Podatki o vremenu za leto 2008 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).

mesec/parameter	povprečna temperatura (°C)	povprečna relativna vlaga (%)	količina padavin (mm)
marec	3,9	79	109,6
april	8,8	72	72
maj	14,8	69	93,8
junij	18,5	76	180,4
julij	19	75	163
avgust	18,3	78	128,1
SKUPAJ	13,88 ± 6,2	74,83 ± 3,8	746,9

Preglednica 56: Podatki o vremenu za leto 2009 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).

mesec/parameter	povprečna temperatura (°C)	ovprečna relativna vlaga (%)	količina padavin (mm)
marec	4,7	70	89,4
april	11,1	74	59,1
maj	15,7	70	73,8
junij	16,8	74	224,4
julij	19,3	74	129,4
avgust	19,4	76	130,5
SKUPAJ	14,50 ± 5,7	73,00 ± 2,4	706,5

Preglednica 57: Povprečni vremenski podatki za leta 2007, 2008, 2009 (postaja: Šmartno pri Slovenj Gradcu), (ARSO, 2012).

leto	povprečna temperatura (°C)	povprečna relativna vlaga (%)	skupna količina padavin (mm)
2007	$14,70 \pm 5,5$	$73,17 \pm 4,4$	798,4
2008	$13,88 \pm 6,2$	$74,83 \pm 3,8$	746,9
2009	$14,50 \pm 5,7$	$73,00 \pm 2,4$	706,5

Iz preglednice 57 je razvidno, da tudi v povprečni temperaturi, povprečni relativni vlagi in skupni količini padavin ni velikih razlik (preglednice 54, 55 in 56). Tako je mogoče reči, da vreme vpliva na količino sterolov, saj med analiziranimi vzorci ni signifikantnih razlik po letnikih, kakor tudi ni razlik v povprečni temperaturi, povprečni relativni vlagi in skupni količini padavin v letih 2007, 2008 in 2009.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Camelina sativa (L.) Crantz ali navadni riček je v Sloveniji še med manj poznanimi poljščinami, ki jih uporabljamo za olje. Olje je zelo koristno, ker vsebuje visok odstotek omega-3 maščobnih kislin (Hrastar, 2011), vsebuje veliko tokoferolov (Bavec, 2001; Zubr in Matthäus, 2002), olje je bogato s fenoli, ki imajo antioksidativno učinkovitost (Terpinc in sod., 2012; Abramovič in sod., 2007), antioksidativno učinkovitost pa ima tudi vitamin E, ki ga prav tako lahko najdemo v ričkovem olju (Hrastar, 2011). Poleg vsega navedenega je olje navadnega rička zelo bogato tudi s steroli (Schwartz in sod., 2008). Zaradi vseh pozitivnih učinkov sestavin ričkovega olja, bi ga lahko uvrstili tudi med funkcionalna živila.

Fitosteroli so sestavni del rastlinskih živil, kjer se nahajajo v več oblikah. Steroli pa so pomembni predvsem iz zdravstvenega vidika, saj vplivajo na nižanje koncentracije LDL holesterola pri ljudeh (Moghadasian in Frolich, 1999). Poleg tega so v raslinah najbolj pogosti steroli: β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol (Lagarda in García-Llates, 2006), te sterole smo tudi mi določali v ričkovem olju. Poleg zgoraj navedenih sterolov smo se dodatno odločili za analizo brasikasterola, ki je značilen za družino križnic, kamor spada navadni riček.

Namen naše raziskave je bil najprej izbrati primerno metodo za določanje sterolov in jo validirati. Za določanje sterolov smo izbrali ekstrakcijo na trdnem nosilcu za izolacijo in čiščenje sterolov iz vzorcev ter plinsko kromatografijo za njihovo kvalitativno in kvantitativno določitev.. Tudi Abidi (2001) navaja plinsko kromatografijo kot najbolj analitično natančno in občutljivo metodo v primerjavi z drugimi.

Rezultati validacije so pokazali, da je metoda primerna za določitev sterolov, saj je specifična in selektivna ter ponovljiva in obnovljiva (z relativnim standardnim odklonom pri brasikasterolu 4,9 %, pri kampesterolu 6,6 %, pri β -sitosterolu 6,9 % in pri stigmasterolu 42,5 %). Metoda je validirana tudi za pravilnost rezultata (recovery), kjer

rezultati kažejo, da so vrednosti med 85,72 in 98,11 %. Poleg navedenega je metoda linearna (za betulin (interni standard) v območju 0,058–0,220 g/L; za brasikasterol v območju 0,00154–0,15 g/L; za kampesterol v območju 0,00544–0,6 g/L; za stigmasterol v območju 0,00307–0,3 g/L in za β -sitosterol v območju 0,0082–0,8 g/L; s povprečnim korelacijskim koeficientom več kot 0,99 pri vseh določenih sterolih). Stabilnost pripravljenih vzorcev se je pokazala z rezultati, saj so koncentracije sterolov v vzorcih (leti so že pripravljeni za analizo z umiljenjem in ekstrakcijo na trdnem nosilcu) na 4 °C neobstoje, ker se koncentracija brasikasterola in β -sitosterola spreminjata, medtem ko se koncentracija kampesterola v pripravljenem vzorcu ohrani 7 dni, koncentracija stigmasterola pa 21 dni. Kljub vsemu se priporoča analiza na GC takoj po pripravi vzorca.

Ko smo metodo uspešno validirali, smo lahko pričeli z analizo sterolov v ričkovem olju. Določali smo koncentracijo sterolov treh zaporednih let v vzorcih slovenskega ričkovega olja in v štirih vzorcih olja iz drugih držav. Ugotovili smo, da med slovenskimi vzorci ni signifikantnih razlik, prav tako ni signifikantnih razlik, kadar primerjamo slovenske vzorce z vzorci iz Finske, Avstrije, Nemčije in Združenih držav Amerike. Ko smo določali koncentracijo brasikasterola v slovenskih vzorcih, je bila povprečna vrednost 23,12 mg/100 g, kar je primerljivo z rezultati raziskave Schwartz in sod. (2008), v njihovih vzorcih je bila koncentracija brasikasterola 27 mg/100 g. Povprečna koncentracija kampesterola v slovenskih vzorcih je bila 165,03 mg/100 g, medtem ko so Schwartz in sod. (2008) v njihovih vzorcih določili, da je bila koncentracija kampesterola 117 mg/100 g. Koncentracija stigmasterola v slovenskih vzorcih je bila 5,46 mg/100 g, Schwartz in sod. (2008) pa so v raziskavi določili, da je bila koncentracija stigmasterola 5,6 mg/100 g. Največji delež sterolov v naši raziskavi pa v ričkovem olju predstavlja β -sitosterol, in sicer 452,40 mg/100 g, v raziskavi Schwartz in sod. (2008) je bila koncentracija β -sitosterola v ričkovem olju 300 mg/100 g. Vsi določeni steroli v naši raziskavi so primerljivi z rezultati raziskave avtorjev Schwartz in sod. (2008), kjer lahko prav tako opazimo, da imajo večjo koncentracijo brasikasterola le še olje oljne ogrščice (72,4 mg/100 g) in margarine (ni navedeno iz katerega rastlinskega olja je proizvedena) (29,3 mg/100 g), vsa ostala olja imajo to koncentracijo nižjo. Olje oljne ogrščice (297,5 mg/100 g), koruzno olje (171 mg/100 g) in olje pšeničnih kalčkov (969 mg/100 g) imajo večjo vsebnost koncentracije kampesterola. Ko primerjamo koncentracijo stigmasterola v ričkovem olju z drugimi olji,

lahko s pomočjo raziskave Schwartz in sod. (2008) ugotovimo, da ima kar nekaj olj večjo vsebnost tega sterola, in sicer sončnično olje (28 mg/100 g), koruzno olje (48 mg/100 g), sezamovo olje (36 mg/100 g), laneno olje (35 mg/100 g) in mast za cvrtje (ni navedeno iz katerega rastlinskega olja je proizvedena) (6,0 mg/100 g). Kljub vsemu je bilo od vseh sterolov stigmasterola v naši raziskavi najmanj, tudi sicer njegove koncentracije v oljih niso visoke. Ko primerjamo β -sitosterol, lahko ugotovimo, da ima olje pšeničnih kalčkov izjemno odstopajočo koncentracijo v primerjavi z drugimi (2510 mg/100 g), večjo koncentracijo ima le še koruzno olje (515 mg/100 g). Glede na primerjavo z drugimi olji lahko rečemo, da ima ričkovo olje zelo visoko vsebnost sterolov.

V zadnjem delu raziskave nas je zanimalo, ali bi lahko podnebne razmere vplivale na količino sterolov v ričkovem olju slovenskega porekla. Žal tega rezultata nismo mogli jasno določiti, saj med vzorci slovenskega olja treh zaporednih let ni bilo signifikantnih razlik. Prav tako ni bilo signifikantnih razlik v vremenskih razmerah (povprečna temperatura, povprečna relativna vlaga in količina padavin v času rastne dobe navadnega rička, to je od marca do avgusta). Tako ne moremo reči, da vreme vpliva na koncentracijo sterolov v ričkovem olju, niti da vreme ne vpliva na koncentracijo.

5.2 SKLEPI

- Kot smo pričakovali, je metoda plinske kromatografije primerna ob predhodni uporabi umiljenja vzorca in ekstrakcije na trdnem nosilcu, saj je bila validacija metode primerna glede na vsa priporočila. S tem smo hipotezo potrdili.
- V splošnem se koncentracije brasikasterola, kampesterola, stigmasterola in β -sitosterola ne razlikujejo glede na to ali so vzorci slovenskega porekla ali so iz drugih državah (Finska, Avstrija, Nemčija, Združene države Amerike). Posledično je ta hipoteza zavržena.
- Naša hipoteza je bila, da se vzorci slovenskega ričkovega olja med seboj ne razlikujejo in to hipotezo smo tudi potrdili. Rezultati so pokazali, da slovenski vzorci povprečno vsebujejo 23,13 mg/100 g brasikasterola, 165,03 mg/100 g kampesterola, 5,46 mg/100 g stigmasterola in 452,40 mg/100 g β -sitosterola.
- Nismo pa mogli niti potrditi niti ovreči hipoteze ali podnebne razmere vplivajo na koncentracijo sterolov v ričkovem olju, saj med rezultati v vzorcih treh zaporednih let ni bilo signifikantnih razlik. Prav tako ni bilo razlike v podnebnih razmerah v letih 2007–2009. Posledično ne moremo reči, da vreme vpliva in niti da ne vpliva na koncentracijo sterolov.

6 POVZETEK

V okviru magistrske naloge smo se glede na teoretično raziskavo obstoječih metod za določanje sterolov odločili za metodo čiščenja vzorca z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) s predhodnim umiljenjem vzorca in kvalitativno ter kvantitativno določitev s plinsko kromatografijo (GC). Prav tako smo se odločili, da bomo izmed vseh sterolov določali najbolj pogoste (β -sitosterol, kampesterol in stigmasterol) in sterol, ki je specifičen za križnice, to je brasikasterol.

Najprej smo izvedli optimizacijo analiznega postopka. Pri tem smo opravili validacijo analiznega postopka, kjer smo določili:

- specifičnost in selektivnost;
- ponovljivost in obnovljivost (z relativnim standardnim odklonom pri brasikasterolu 4,9 %, pri kampesterolu 6,6 %, pri β -sitosterolu 6,9 % in pri stigmasterolu 42,5 %);
- standardni dodatek (recovery, kjer rezultati kažejo, da so vrednosti med 85,72 in 98,11 %);
- linearnost (metoda je linearna za betulin (interni standard) v območju 0,058–0,220 g/L, za brasikasterol v območju 0,00154–0,15 g/L, za kampesterol v območju 0,00544–0,6 g/L, za stigmasterol v območju 0,00307–0,3 g/L in za β -sitosterol v območju 0,0082–0,8 g/L, s povprečnim korelacijskim koeficientom več kot 0,99 pri vseh določenih sterolih),
- stabilnost (rezultati kažejo, da so koncentracije sterolov v vzorcih (le-ti so že pripravljeni za analizo z umiljenjem in ekstrakcijo na trdnem nosilcu) na 4 °C neobstoje, saj se koncentracija brasikasterola in β -sitosterola spreminjata, medtem ko se koncentracija kampesterola v pripravljenem vzorcu za GC ohrani 7 dni, koncentracija stigmasterola pa se ohrani 21 dni).

Ugotovili smo, da je metoda po vseh priporočilih primerna glede validacije, to pa je pomenilo, da smo lahko pričeli z analizo vzorcev. Pri validaciji metode so bili rezultati zelo dobri, razen pri stabilnosti vzorcev v hladilniku pri 4 °C. Kar posledično pomeni, da je potrebno GC-analizo vzorca narediti vedno takoj po pripravi vzorca s SPE.

Zatem smo določili vsebnost β -sitosterola, kampesterola, stigmasterola in brasikasterola v 29-ih vzorcih. Od teh vzorcev so 4 vzorci prinešeni iz tujih držav, in sicer s Finske (brasikasterol (23,61 mg/100g), kampesterol (152,43 mg/100g), stigmasterol (4,48 mg/100g) in β -sitosterol (434,97 mg/100g)), iz Avstrije (brasikasterol (20,39 mg/100g), kampesterol (122,96 mg/100g), stigmasterol (4,81 mg/100g) in β -sitosterola (333,60 mg/100g), Nemčije (brasikasterol (25,80 mg/100g), kampesterol (175,23 mg/100g), stigmasterol (9,36 mg/100g) in β -sitosterola (471,04 mg/100g) in iz Združenih držav Amerike (brasikasterol (21,16 mg/100g), kampesterol (155,97 mg/100g), stigmasterol (20,81 mg/100g) in β -sitosterola (388,52 mg/100g). Ostalih 25 vzorcev je bilo slovenskega izvora (iz Koroške) in se delijo po letnikih (letnik 2007, 2008, 2009). V slovenskih vzorcih smo določili, da je koncentracija brasikasterola (23,13 mg/100g), kampesterola (165,03 mg/100g), stigmasterola (5,46 mg/100g) in β -sitosterola (452,40 mg/100g). Glede na letnik smo želeli ugotoviti, ali vremenske razmere vplivajo na količino sterolov v navadnem ričku in posledično v ričkovem olju. Ker so rezultati analize vzorcev pokazali, da med letniki vzorcev olja ni statističnih razlik, posledično tudi pri vremenskih razmerah ni bilo statističnih razlik, zato težko sklepamo, ali imajo lahko vremenske razmere kakšen vpliv na količino sterolov v ričkovem olju. V primeru, da bi med vzorci bila razlika v količini sterolov po letniku in pri vremenskih razmerah ne bi bilo statističnih razlik, bi lahko sklenili, da vreme ne vpliva na količino sterolov v olju ali obratno. Prav tako pa smo iz rezultatov analize ugotovili, da ni statističnih razlik med vzorci ričkovega olja slovenskega izvora in vzorci s Finske, iz Avstrije, Nemčije in Združenih držav Amerike.

Glede na količino sterolov v drugih oljih v raziskavi Schwartz in sod. (2008), bi lahko uvrstili ričkovo olje med olja, ki imajo večjo vsebnost sterolov.

7 VIRI

- Abidi S. L. 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in food and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935, 1–2: 173–201
- Abramovič H., Abram V. 2005. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 63–70
- Abramovič H., Butinar B., Nikolič V. 2007. Changes occurring in phenolic content tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage, *Food Chemistry*, 104, 3: 903–909
- Agilent Technologies. 2002. Agilent gas chromatographs: Manual. Santa Clara, Agilent Technologies: 58 str.
- ARSO. 2012. Arhiv meritve: postaja Šmartno pri Slovenj Gradcu. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za okolje: baza podatkov (<http://www.meteo.si/met/sl/app/webmet/>) (21.7.2012)
- Bavec M. 2001. Ekološko kmetijstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 210–213
- Baxter S. D. 2008. Nutrition for healthy children and adolescents aged 2 to 18 years. V: *Handbook of nutrition and food*. 2nd ed. Berdanier C. D., Dwyer J., Fedeman E. B. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 285–344
- 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, 2: 446–454
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. 2009. *Food chemistry*. 4th rev. and extended ed. Berlin, Springer: 1070 str.
- Bohanec S. 1998. Osnove statistike in statistični testi. V: *Statistične metode in merilna negotovost: Zbornik predavanj*, Ljubljana, 5. februar 1988, Komarc M. (ur.). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 1–19
- Boyer R. F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Connor W. E. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 171–175

- Černe A. 2005. Holesterol in trigliceridi-maščobe v krvi. Trzin, Fidimed: 1 str.
http://www.fidimed.si/zdravstvene_teme/clanki_strokovnjakov/22/holesterol_in_trigliceridi_mascope_v_krvi.html (15.4.2012)
- Fidler Mis N., Širca Čampa N. 2009. Prehrana za preprečevanje bolezni srca in ožilja ter dietna obravnava dislipidemij pri otrocih in mladostnikih. Slovenska pediatrija, 16: 176–199
- Fröhlich A., Rice B. 2005. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production. Industrial Crops and Products, 21, 1: 25–31
- Friedt W., Büchsenschütz-Northdurft A., Bickert C., Schuster A. 1994. Züchteridche und produktiomstechnische Bearbeitung von Lein und Leindotter in Hinblick auf eine Verwertung als nachwachsender Rohstoff. Vorträge für Pflanzenzüchtung, 30: 158–172
- Gurr M. I., Harwood J. L., Frayn K. N. 2002. Lipid biochemistry: an introduction. 5th ed. Oxford, Blackwell Science: 320 str.
- Hrastar R. 2011. Karakterizacija, deodorizacija in ugotavljanje pristnosti ričkovega olja (*Camelina sativa* (L.) crantz). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 78 str.
- Jansen H.D., Steffen M. C. 1992. Abpressen von Öl aus Nachwachsenden Rohstoffen. Mühle & Mischfuttertechnik, 129, 17: 211–214
- Jeseničnik A. 2004. Značilnosti in sestava olja rička (*Camelina sativa*) pridobljenega izrazličnih rastišč in z različnimi tehnologijami. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 46 str.
- Jordan G.R. 2010. Prenatal omega-3 fatty acids: Rewiew and recommendations. Journal of Midwfery & Womens Health, 55: 520–528
- Klofutar C. 1992. Fizikalno kemijske lastnosti triacilglicerolov. V: Lipidi. 14. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 4. in 5. junij 1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11–16

- Koren A. 1992. Fiziologija lipidov. V: Lipidi. 14. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 4. in 5. junij 1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 28–34
- Kritchevsky D., Chen S.C. 2005. Phytosterols – health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research*, 25, 5: 413–428
- Kritchevsky D. 2008. Fats and oils in human health. V: Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology. 3rd ed. Akoh C. C., Min D. B. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 499–511
- Lagarda M. J., García-Llatas, Farré R. 2006. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 5: 1486–1496
- Lange R. Schumann W., Petrzika M., Busch H., Marquard R. 1995. Glucosinolate in Leindottersamen. *Lipid/Fett*, 97, 4: 146–152
- Lobb K., Chow C. K. 2008. Fatty acid classification and nomenclature. V: Fatty acids in foods and their health implications. 3rd ed. Chow C. K. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 1–15
- Luigi R. G. 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, 77: 937–946
- Mithen R. F., Dekker M., Verkerk R., Rabot S., Johnson I. T. 2000. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 7: 967–984
- Moder M. 1998. Validacija analizne metode. V: Statistične metode in merilna negotovost: Zbornik predavanj, Ljubljana, 5. februar 1988, Komarc M. (ur.). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 43–53
- Moghadasian M. H., Frolich J. J. 1999. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence. *American Journal of Medicine*, 107, 6: 588–594
- Nemivšek M. 2006. Določanje sladil k-acesulfama in saharina ter konzervansov benzojske in sorbinske kisline v živilih s tekočinsko kromatografijo. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 93 str.

- Pratnekar S. 1996. Fizikalne in kemijske lastnosti olja semen navadnega rička (*Camelina sativa* (L.) Crantz). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 72 str.
- Przybylski R. 2005. Flax oil and high linolenic oils. V: Bailey's industrial oil and fat products. Vol. 2. 6th ed. Shahidi F. (ed.). New York, Wiley: 281–301
- Putnam D. H., Budin J. T., Field L. A., Breene W. M. 1993. Camelina: A promising low-input oilseed. V: New crops. Janick J., Simon J. E. (eds.). New York, Wiley: 314–322
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 215 str.
- Rode J. 2002. Study of autochthon *Camelina sativa* (L.) Crantz in Slovenia. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 9, 4: 313–318
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 376 str.
- Salobir K. 2001. Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121–135
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.-M. 2008. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. Journal of Food Composition and Analysis, 21, 2: 152–161
- SIST EN ISO 3696. Voda za analitsko laboratorijsko opremo-specifikacija in preskusne metode = Water for analytical laboratory use-specification and test methods. 1998: 5 str.
- Terpinc P., Polak T., Makuc D., Poklar Ulrih N., Abramovič H. 2012. The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. Food chemistry, 131, 2: 580–589
- Zubr J. 1997. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. Industrial Crops and Products, 6, 2: 113–119
- Zubr J. 2010. Carbohydrates, vitamins and minerals of *Camelina sativa* seed. Nutrition and Food Science, 40, 5: 523–531

Zubr J., Matthäus B. 2002. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*, 15, 2: 155–162

Zupan J. 2009. Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. Ljubljana, Inštitut nove revije, Zavod za humanistiko, Kemijski inštitut: 368 str.

ZAHVALA

Optimizem je vera, ki vodi do uspeha. Ničesar se ne da narediti brez upanja in zaupanja.

(Helen Keller)

Ob tej priložnosti bi se zahvalila mentorju prof. dr. Janezu Hribarju za pomoč in nasvete pri nastajanju magistrskega dela.

Posebna zahvala gre somentorju doc. dr. Iztoku Jožetu Koširju za vso pomoč pri nastajanju magistrskega dela, hvala tudi za potrpežljivost in razumevanje, za strokovne nasvete, za vodenje pri praktičnem delu. Brez njega naloga ne bi bila takšna kot je.

Lepo se zahvaljujem tudi recenzentki prof. dr. Heleni Abramovič za strokovni in temeljit pregled naloge ter za vse nasvete, da je naloga dobila pravo podobo.

Iskreno se zahvaljujem vsem zaposlenim na Oddelku za agrokemijo in pivovarstvo na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Predvsem se zahvaljujem za vso pomoč pri praktičnem delu naloge, za pomoč pri uvajanju v samostojno delo v laboratoriju, za nasvete in spodbudne besede. Še posebej hvala Tanji za nasvete in prijetno vzdušje med delom.

Univ. dipl. inž. Lini Burkan Makivić se zahvaljujem pregled referenc in oblike magistrske naloge.

Posebna zahvala gre tudi moji družini, mami in ati, hvala ker sta mi omogočila študij in me vse čas spodbujala in mi pomagala. Polona in Boštjan hvala za sestrške in bratske nasvete, tudi vama ker sta mi stala ob strani in kdaj kaj postorila namesto mene. Hvala celi družini, brez vas ne bi danes postala to, kar sem.

Matej hvala ti za vse spodbudne besede, za potrpežljivost ter moralno in čustveno podporo pri nastajanju naloge in med samim študijem.

Zahvaljujem pa se tudi vsem sošolcem in prijateljem, ker ste mi polepšali čas študija. Hvala vam za naklonjenost, podporo v težkih trenutkih in za vsa doživetja zaradi katerih se bom študijskih let vedno z veseljem spominjala.

Zahvaljujem se vsem ki so mi kakorkoli pomagali v času študija, me vzpodbujali in mi pomagali z nasveti, nasmehi ali pa so mi bili zgolj vzor.