

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara POLDA

VSEBNOST FENOLOV V PLODIČIH OREHA
(*Juglans regia* L.)

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara POLDA

VSEBNOST FENOLOV V PLODIČIH OREHA (*Juglans regia* L.)

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE TOTAL PHENOLS CONTENT IN GREEN WALNUTS
(*Juglans regia* L.)**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za sadjarstvo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Rastlinski material za analizo smo nabrali na Raziskovalnem polju za lupinasto sadje Maribor.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Francija ŠTAMPARJA in za somentorja doc. dr. Roberta VEBERIČA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: akad. prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franci ŠTAMPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Robert VEBERIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnica Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Barbara POLDA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 634.51:547.56:66.061(043.2)
KG sadjarstvo/oreh/*Juglans regia*/plodiči oreha/'Franquette'/'Elit'/topila/fenolne snovi
KK AGRIS F50
AV POLDA, Barbara
SA ŠTAMPAR, Franci (mentor)/ VEBERIČ, Robert (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2008
IN VSEBNOST FENOLOV V PLODIČIH OREHA (*Juglans regia* L.)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 31, [1] str., 1 pregl., 14 sl., 45 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naše raziskave je bil proučiti učinkovitost dveh topil pri ekstrakciji fenolov iz plodičev oreha *Juglans regia* L.. To smo preverili pri dveh sortah in v dveh terminih. Prvi termin je bil 30. 6. 2005, drugi pa 7. 7. 2005. Sorti, ki smo ju uporabili, sta 'Elit' in 'Franquette', ki ju slovenski sadni izbor priporoča za gojenje v krajih s poznimi spomladanskimi slanami, saj se jim uspešno izogneta, ker pozno odganjata. Mlade orehove plodiče smo s pomočjo tekočega dušika zmleli v terilnici in jih prelili s 5 ml ekstrakcijske raztopine. Kot ekstrakcijski raztopini smo uporabili metanol z 1 % BHT in etanol z 1 % BHT in ekstrakte analizirali na HPLC. Rezultati raziskave so pokazali, da je etanol ustrežnejše topilo za ekstrakcijo elagne in sinapinske kisline, metanol pa ustrežnejše topilo za ekstrakcijo galne, klorogenske kisline ter (+)-katehina in juglona. Skupna največja vrednost ekstrahiranih fenolov je bila pri sorti 'Franquette'.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 634.51:547.56:66.061(043.2)
CX fruit growing/walnut/*Juglans regia*/green young walnuts/'Franquette'/'Elit'/solvents/
phenolic compounds
CC AGRIS F50
AU POLDA, Barbara
AA ŠTAMPAR, Franci (supervisor)/ VEBERIČ, Robert (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Agronomy
PY 2008
TI THE TOTAL PHENOLS CONTENT IN GREEN WALNUTS (*Juglans regia* L.)
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 31, [1] p., 1 tab., 14 fig., 45 ref.
LA sl
AL en/sl
AB The aim of our investigation was to find out the efficiency of ethanol and methanol as solvents for extraction of phenolics from green walnuts. Green fruits of different walnut cultivars 'Elit' and 'Franquette', were sampled on two different dates. These dates were 30. 6. 2005 and 7. 7. 2005. These cultivars are recommended for Slovenian climate, where late frost can be expected in spring. Both 'Elit' and 'Franquette' sprout late, so there is no danger to frost. Green walnuts were grounded to a fine powder with liquid nitrogen and treated with 5 ml of extraction solutions. Two different solvents were used: MeOH with 1 % BHT and EtOH with 1 % BHT and analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Results showed the difference in extraction between solvents. Ethanol was found to be the best solvent for ellagic and sinapic acid and methanol for gallic, chlorogenic acid, (+)-catechin and juglone. The highest amount of all phenolics were from cultivar 'Franquette'.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key word documentation	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 VZROK ZA RAZISKAVO.....	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE.....	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OREH (<i>Juglans regia</i> L.).....	2
2.1.1 Ekološke zahteve.....	2
2.1.2 Cvetenje oreha in rodni les	2
2.1.3 Plod	4
2.2 UPORABNOST OREHA.....	4
2.2.1 Oreh kot zdravilna rastlina	5
2.2.2 Orehovec.....	5
2.3 FENOLNE SNOVI V OREHU	6
2.3.1 Funkcija fenolnih spojin	8
2.4 IZBIRA TOPILA.....	9
2.4.1 Alkoholi	9

3	MATERIAL IN METODE	11
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	11
3.1.1	Sorta 'Elit'	11
3.1.2	Sorta 'Franquette'	11
3.2	METODA DELA	12
3.2.1	Priprava vzorca in ekstrakcija fenolov iz zelenih plodičev oreha.....	12
3.2.2	Analiza fenolov s HPLC	12
3.2.3	Kemikalije	13
3.2.4	Statistična obdelava podatkov	13
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	14
4.1	VSEBNOST FENOLOV	14
4.1.1	Elagna kislina	14
4.1.2	Galna kislina	16
4.1.3	Juglon.....	17
4.1.4	(+)-katehin	19
4.1.5	Klorogenska kislina	21
4.1.6	Sinapinska kislina	23
4.1.7	Skupna količina ekstrahiranih fenolnih snovi	24
5	SKLEPI	26
6	POVZETEK	27
7	VIRI	28
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi (Abram in Simčič, 1997)	7

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: a - zeleni plodiči oreha, b1 - moško socvetje, b2 - ženski cvet, c - prerez skozi zeleno lupino plodu, d - orehovo jedro, e1 - vzdolžni prerez skozi orehovo lupino, e2 - prečni prerez skozi orehovo lupino (Navadni oreh, 2008)	3
Slika 2: Povprečna vsebnost elagne kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	14
Slika 3: Povprečna vsebnost elagne kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	15
Slika 4: Povprečna vsebnost galne kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	16
Slika 5: Povprečna vsebnost galne kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	17
Slika 6: Povprečna vsebnost juglona \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	18
Slika 7: Povprečna vsebnost juglona \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	19
Slika 8: Povprečna vsebnost (+)-katehina \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.	20

- Slika 9: Povprečna vsebnost (+)-katehina \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$. 21
- Slika 10: Povprečna vsebnost klorogenske kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$. 22
- Slika 11: Povprečna vsebnost klorogenske kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$. 22
- Slika 12: Povprečna vsebnost sinapinske kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$. 23
- Slika 13: Povprečna vsebnost sinapinske kisline \pm standardna napaka v mg/100g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$. 24
- Slika 14: Skupna količina izločenih fenolnih snovi v metanolu in etanolu, pri dveh sortah oreha 'Elit' in 'Franquette' in v dveh različnih terminih. 25

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
MeOH	metanol
EtOH	etanol
BHT	2,6-di-tert-butil-4-metilfenol

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Fenolne snovi so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinah. So snovi, ki jih rastlina proizvaja, da se zaščiti pred stresnimi situacijami, ki ji jih povzročajo patogeni organizmi in spremenljive okoljske razmere, privlačijo pa tudi opraševalce rastlin in prenašalce semen, delujejo kot alelopatske snovi in dajejo mehansko oporo rastlini (Rastlinski sekundarni metaboliti, 2005/06). Fenolne snovi so pomembne kot antioksidanti, kot dodatki v prehrani, prav tako pa so pomembne tudi v papirni, kozmetični in lesni industriji.

Zaradi naraščajočega zanimanja, poteka vse več raziskav o fenolnih snoveh v različnih sadnih vrstah, najboljšem postopku odkrivanja teh snovi in o njihovi antioksidativni moči.

Oreh je drevo, ki ga srečamo na vsakem kmečkem dvorišču, vse več pa je tudi nasadov cepljenih orehov. Pri orehu se fenolne snovi pojavljajo v vseh organih oreha, v različnih koncentracijah. Raziskovali so že fenolne snovi v orehovem listju, zrelih plodovih in orehovcu, ki se v Sloveniji tradicionalno prideluje.

1.2 NAMEN RAZISKAVE

V Sloveniji iz zelenih plodičev oreha tradicionalno pridelujemo orehovec, zato je smiselno raziskati kakšne in koliko fenolov vsebujejo zeleni plodiči. Tradicionalno se orehovec prideluje iz domačega žganja, ki vsebuje tudi večje koncentracije etanola. Pri laboratorijskih raziskavah pa kot priporočeno topilo pogosto uporabljamo metanol.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti učinkovitost ekstrakcije fenolnih snovi z etanolom v primerjavi z metanolno ekstrakcijo. Poleg tega pa smo opazovali tudi razliko v vsebnosti fenolnih snovi pri dveh različnih sortah orehov v dveh različnih terminih.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da v učinkovitosti ekstrakcije fenolnih snovi obstaja razlika med topili, metanolom in etanolom.

Predvidevamo pa tudi, da obstaja razlika med sortama. To smo preverjali pri dveh sortah orehov, ki imata različen genotip: 'Elit', ki je selekcija Zavoda za sadjarstvo Maribor in francoski sorti 'Franquette'. Obe sorti sta primerni za gojenje v Sloveniji, saj pozno odganjata in ni nevarnosti, da bi pozebli ob spomladanskih slaneh.

Predvidevali pa smo tudi, da čas nabiranja plodičev lahko vpliva na količino pridobljenih fenolnih snovi, zato smo jih nabrali v dveh terminih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OREH (*Juglans regia* L.)

Družina *Juglandaceae* vsebuje sedem rodov in okrog 60 vrst listnatih enodomnih dreves s pernato sestavljenimi listi. Pomembnejši je rod *Juglans* (orehi), izmed ostalih pa rod *Carya* (pekan oreh). Rod *Juglans* vsebuje okrog 20 različnih vrst. Gospodarsko najbolj pomembna vrsta je *Juglans regia* L. - perzijski, navadni ali angleški oreh, ki raste v Evropi, Aziji, severni, osrednji in južni Ameriki, na ozemlju bivše Sovjetske zveze in v omejenem obsegu tudi v Oceaniji in severni Afriki (Solar, 2006).

Oreh je stara, tradicionalna in široko razširjena sadna vrsta tudi v Sloveniji. Raste na vseh koncih Slovenije, od obale pa vse do okrog 1000 m nadmorske višine. Večina predstavnikov te sadne vrste raste na vzhodu v bližini vinogradov in na zahodu, kjer se čuti vpliv Jadranskega morja.

2.1.1 Ekološke zahteve

Za gojenje oreha so najbolj primerna zmerno topla, humidna območja, s čim manjšimi temperaturnimi nihanji. Glavni omejitveni dejavnik za gojenje orehov v Sloveniji so nizke temperature, ki se pojavljajo pozno spomladi, v začetku rasti in v cvetenju. Med fiziološkim mirovanjem je oreh zelo odporen proti mrazu. V sortimentu, ki se priporoča za Slovenijo, sta za kontinentalno območje s poznimi spomladanskimi slanimi, med glavnimi sortami naštetih sorti 'Elit' in 'Franquette' (Solar, 2006).

Oreh je izrazita rastlina sonca. Naravna oblika orehovega drevesa s svojo razvejanostjo čimbolj izkorišča svetlobo, zato so brežine in rahlo nagnjene lege bolj primerne za gojenje oreha kot ravnine. Dobro raste in redno rodi samo na kakovostnih tleh, ki morajo biti dobro zračna, strukturna, z veliko vodno kapaciteto in odcedna. Glede reakcije tal oreh ni posebno občutljiv. Je velik porabnik vode in potrebuje enakomerno preskrbljenost preko cele rastne sezone. Pomanjkanje vlage povzroča počasnejšo rast mladik, slabšo oploditev in nastavek plodov, počasnejšo rast plodov in predčasno odpadanje, slabšo diferenciacijo cvetnih brstov itd. (Solar, 2006).

2.1.2 Cvetenje oreha in rodni les

Oreh je enodomna rastlina z ločenimi moškimi in ženskimi cvetovi (slika 1). Moška socvetja imajo obliko mačic ali res, ki so sestavljene iz 70 do 150 cvetov in se razvijejo iz cvetnih brstov, ki so v pazduhah listov nameščeni vzdolž poganjkov. Ženski cvetovi se razvijejo iz mešanih brstov, ki so običajno na koncu enoletnih poganjkov kot terminalni brsti. Iz njih se razvijejo mladike z dvema do petimi listi, na njihovem vrhu pa so običajno eden do štiri ženski cvetovi.



Slika 1: a - zeleni plodiči oreha, b1 - moško socvetje, b2 - ženski cvet, c - prerez skozi zeleno lupino plodu, d - orehovo jedro, e1 - vzdolžni prerez skozi orehovo lupino, e2 - prečni prerez skozi orehovo lupino (Navadni oreh, 2008)

Oreh je vetrocvetka. Zaradi prisotnosti moških in ženskih cvetov na isti rastlini spada teoretično med samooplodne sadne vrste, vendar je samooploditev redka. Glavni vzrok je časovno neizenačeno cvetenje moških in ženskih cvetov (Ocepek, 1995).

Delno samooplodne, ki cvetijo homogamno, so tudi nekatere domače selekcije, med njimi tudi sorta 'Elit' (Solar, 2006).

Rodni brst je običajno končni brst na toletni mladiki. Izjema so nekatere sorte, pri katerih so zasnove za ženski cvet tudi v lateralnih brstih neposredno pod terminalnim. Sodobna selekcija in hibridizacija gresta v smeri sort z rodnimi lateralnimi brsti, saj je njihov rodni potencial bistveno večji kot pri orehih, ki rodijo le na končnih brstih (terminalno rodni) (Solar, 2006).

2.1.3 Plod

Orehov plod se sestoji iz zunanjšega zelenega ovoja - eksokarpa ali lupine in trdnega svetlo rjavega endokarpa ali olesenele luščine, v kateri je seme ali jedrce (slika 1). Lupina se razvije iz zunanjšega dela plodnice. Debelina lupine je od 3 do 5 mm in je sortno značilna. Med zorenjem plodov tkivo lupine počni in se loči od luščine. Luščina je sestavljena iz dveh simetričnih polovic, ki sta zrasli s šivom. Večja ali manjša razbrazdanost in njena debelina sta odvisni od sorte. Oblika plodov je lahko različna. Največkrat je odvisna od sorte. Jedrce je sestavljeno iz dveh polovic, loči ju tanka olesenela pregrada, ki se zlahka lomi. Bolj je razvita pri dnu kot pri vrhu jedrca (Ocepek, 1995).

Po oploditvi začne plod hitro rasti. V prvem mesecu zraste do treh četrtin svoje velikosti. Sicer pa potrebuje oreh za razvoj plodu od oploditve do izpada iz lupine 130 do 150 dni. Veliko padavin v juniju pospešuje rast, povečuje velikost plodu in drugih delov oreha. Razvijajo se listi in mladike, ki postajajo temno zelene barve. V juliju oreh oblikuje luščino, ki postopoma otrdi, v avgustu polni jedro in debeli lupino. Konec septembra (zgodnje sorte) in oktobra lupina odstopi od luščine in poka. Plod je zrel in izpade iz nje (Ocepek, 1995).

2.2 UPORABNOST OREHA

Oreh spada med lupinasto sadje. Čeprav gojimo pri nas orehe predvsem zaradi jedrc, posredno pa tudi zaradi lesa, ima oreh izredno široko uporabno vrednost. Je cenjeno prvorazredno koncentrirano živilo, v katerem je veliko maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov, rudninskih snovi in vitaminov, predvsem A, B, C in E. Jedrca vsebujejo tudi jod. V orehu je približno 62 % maščob, 16 % beljakovin, 12 % ogljikovih hidratov, 2,5 % celuloze, 1,5 % rudninskih snovi itn. Poleg tega je oreh cenjen tudi v proizvodnji zdravil in kozmetičnih sredstev, lesni industriji ter industriji predelave kož. Zelene lupine, listje, lubje in korenine se uporabljajo za barvanje tkanin in lesnih izdelkov ter strojenje kož, saj vsebujejo tanin. Orehov les pa je cenjen v mizarstvu, v vojaški industriji itn. Uporabni so torej skoraj vsi deli orehovega drevesa (Ocepek, 1995).

2.2.1 Oreh kot zdravilna rastlina

Oreh se uporablja tudi kot zdravilna rastlina. Uradna medicina uporablja liste in posušeno zeleno lupino. Čaj iz orehovitih listov čisti kri, zunanje ga uporabljamo kot kopeli, obkladke ali za spiranje pri otečenih žlezah, rahitisu, krvavenju dlesni, očesnih vnetjih in pri splošni slabosti (Keršek, 2006).

V ljudskem zdravilstvu ga Simon Ašič priporoča za zdravljenje črevesja, jeter, slabokrvnosti, sladkorne bolezni, zlatenice, želodca. Uporablja liste za čaj in kopeli in zelene plodove za izvleček in tinkture (Ašič, 1984).

Mességué (1980) priporoča uporabo vseh delov oreha, od listov, lubja, mačic, soka, popkov, kakor tudi zelene lupine. Zelo sladek orehov sok je čistilo za kri. Popke se uporablja za pripravo mazila zoper izpadanje las in prhljaj. Mačice krčijo kapilare in so korisne pri krvavitvah, urezih, notranjih krvavitvah, močnem mesečnem perilu, zlati žili, driskah in griži. Orehovo lubje učinkuje proti glistam. Listi učinkujejo zaradi grenčin in trpkosti v istih primerih kot mačice. Sveže ali poparjene se uporablja za preganjanje zajedalskih in nadležnih žuželk. Liste je mogoče uporabiti tudi proti čirum, očesnemu vnetju, aftam. So uspešno naravno zdravilo zoper beli tok, pomagajo pa tudi pri uničenju glist, pospešujejo ozdravitev pri tuberkulozi in znižujejo stopnjo grozdnega sladkorja v krvi pri sladkorni bolezni.

Liste nabiramo junija in jih na hitro posušimo, da ne počrnijo. Hranimo jih v dobro zaprtih posodah. Suhi imajo močan, aromatičen vonj in oster, trpek okus, saj vsebujejo čreslovine (10 %) predvsem kot elagotanine, flavonoide, hlapno olje, naftokinonska derivata juglon in hidrojuglon in njune glikozide. Juglon je zelo nestabilen in polimerizira v rjavočrne pigmente. Juglon ima antibiotični in antimikotični učinek. Iz svežih listov in zelenih lupin plodov pridobljeni juglon, kot barvilo dodajajo kremam in oljem za sončenje. Z beljakovinami kože se juglon poveže v rumeno rjave komplekse in kožo obarva (Galle - Toplak, 2002).

Posušene liste ali zeleno lupino plodov dodajajo tudi živalski krmi pri driskah, napihnjenosti, slabi prebavi, pri kolikah in drugih črevesnih obolenjih. Pripravki iz zelenih lupin so učinkoviti kot obloge pri ranah, čirih, kožnih obolenjih in podobnih težavah (Galle - Toplak, 2002).

2.2.2 Orehovec

Orehovec je alkoholna pijača, ki se v Sloveniji tradicionalno prideluje. Podobna pijača je poznana tudi v Italiji, pod imenom nocino, njen izvor pa menda sega v čase Keltov. Orehovec je liker temno rjave barve, grenkega okusa, ki ga pogosto strežejo kot aperitiv, uporablja pa se tudi kot univerzalno sredstvo za različne težave z želodcem. Trpkost je povezana z vsebnostjo fenolnih komponent (Jakopič in sod., 2006). Kot poročajo Štampar in sod. (2006), je orehovec bogat s fenoli.

Mlade zelene, še neolesenele orehe nabiramo konec junija. Tradicionalno se v Italiji nabirajo 24. junija, na dan, ki sovpada s poletnim solsticijem. Alamprese in Pompei (2004) priporočata nabiranje zelenih plodičev za pripravo orehovega likerja najkasneje do tega datuma, bolje prej, če želimo pridobiti maksimalno količino fenolnih snovi. Tudi raziskava Jakopič in sod. (2006) je potrdila, da je zadnji teden junija najprimernejši čas za nabiranje zelenih orehov.

Receptov za pripravo orehovca je precej, eden je opisan v nadaljevanju. Junija naberemo zelene orehe, jih operemo s hladno vodo, narežemo na tanke rezine in stresemo v steklenico. Dodamo ingver, nageljnovi žbice ali cimeta in prelijemo s 45 do 50 % domačim žganjem. Na liter žganja pride 20 do 25 nezrelih orehov in po pol grama ingverja in cimeta ter gram nageljnovih žbic. Steklenico zamašimo in za mesec dni pustimo na toplem. Dodamo 2,5 decilitra sladkane vode (nasičena sladkorna raztopina, ki jo enkrat prekuhamo in ohladimo). Spet pustimo zaprto steklenico za tri do štiri tedne na toplem, potem precedimo. Starejši kot je orehovec, boljši je (Keršek, 2006).

2.3 FENOLNE SNOVI V OREHU

Spojine v živih organizmih lahko razdelimo na dve glavni skupini: primarne in sekundarne metabolite. Primarni metaboliti so tisti, ki nastanejo in so vključeni v primarne metabolne procese, tako kot npr. glikoliza, celično dihanje in fotosinteza. Sekundarni metaboliti nastajajo iz primarnih metabolitov (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine, nastajajo iz aminokislina fenilalanin ali iz njenega prekursorja, šikimske kisline. Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več -OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajno spojine z več -OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime - polifenoli (Abram, 2000).

V preglednici (Preglednica 1) na naslednji strani je prikazana razdelitev fenolnih spojin po številu C-atomov.

Enostavni fenoli C_6 niso razširjeni.

V rastlinah skoraj povsod najdemo fenolne kisline (C_6C_1), kot so vanilna, siringinska in galna kislina, ki je običajno v polimerizirani obliki. Fenolne kisline spadajo med enostavne fenole, ki vsebujejo eno karboksilno funkcionalno skupino.

Prav tako so v skoraj vseh višjih rastlinah prisotne fenilacetne kisline (C_6C_2), kot sta p-kumarna in kavna kislina ter njuna metilirana derivata - ferulna in sinapinska kislina. Najdemo jih proste in še pogosteje kot estre.

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi (Abram in Simčič, 1997).

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina	Vir
6	C_6	Enostavni fenoli	
7	C_6C_1	Fenolne kisline	zelo razširjene
8	C_6C_2	Fenilocetne kisline	
9	C_6C_3	Hidroksicimetne kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni	muškadni orešek orhideje hortenzija
10	C_6C_4	Naftokinoni	orehi
13	$C_6C_1C_6$	Ksantoni	zelo razširjen
14	$C_6C_2C_6$	Stilbeni Antrakinoni	jetrenjak rabarbara
15	$C_6C_3C_6$	Flavonoidi	zelo razširjeni
18	$(C_6C_3)_2$	Lignani Neolignani	iglavci
30	$(C_6C_3C_6)_2$	Biflavonoidi	kritosemenke
n	$(C_6C_3)_n$	Lignini	celične stene
	$(C_6)_n$	melanini	
	$(C_6C_3C_6)_n$	kondenzirani tanini	

Flavonoidi so spojine, ki imajo 15 C-atomov in osnovno strukturo ($C_6C_3C_6$), ki se imenuje flavan oziroma 2-fenilbenzopiran. Flavonoidi so razširjena skupina vodotopnih fenolnih spojin. Največ je antocianov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov. Mnogi od njih so obarvani, običajno so v vakuolah, nekatere najdemo tudi v kromo- ali kloroplastih (Abram in Simčič, 1997). V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza), ali pa tudi daljše verige na obroč. Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon (Abram, 2000).

Orehi vsebujejo precej fenolnih snovi kar dokazuje rahlo trpek okus orehov. V orehu, znotraj lupine, prekriva jedrce tanka, rjava kožica, ki predstavlja samo 5 % mase plodu, vendar je zelo bogata z antioksidantnimi fenolnimi komponentami, ki pomagajo ščititi lipide v jedrcu pred oksidacijo.

Fenolne snovi iz oreha imajo pozitiven vpliv na zdravje, npr. na zmanjšanje srčnih bolezni, preventivno delujejo proti različnim vrstam raka in delujejo protivnetno. Juglon, ki je znan po svojih antimikrobnih učinkih, zmanjšuje pojavljanje tumorjev v tankem črevesju podgan. V orehovem jedrcu in kožici, ki ga prekriva, so našli klorogensko kislino, kavno kislino, p-kumarno kislino, ferulno, sinapinsko in elagno, kot tudi siringaldehid in juglon. V sorti 'Franquette' so našli glede na ostale sorte, ki so jih primerjali, največjo vsebnost elagne kisline (Colarič in sod., 2005).

Vsebnost fenolnih snovi se razlikuje glede na sorto orehov. V raziskavi Jakopič in sod. (2006), kjer so primerjali slovensko sorto 'Elit' in francosko sorto 'Franquette', so največjo količino fenolnih snovi pridobili pri sorti 'Franquette'.

Analize so pokazale, da je rjava kožica, ki prekriva jedro, boljši vir fenolnih sestavin kot jedrce. Pri sorti 'Elit' so v njej ugotovili največjo vsebnost p-kumarne kisline (Colarič in sod., 2005). V zelenih plodičih oreha pa so odkrili trinajst fenolnih snovi: klorogensko, kavno, ferulno kislino, sinapinsko, galno in elagno kislino, protokatehulno, siringinsko, vanilno kislino, katehin, epikatehin, miricetin in juglon. Določili so tudi 1, 4-naftokinon. Glavna fenolna sestavina zelenih lupin pa je juglon (Štampar in sod., 2006).

Zunanje plasti semen običajno vsebujejo večjo količino polifenolnih spojin, kar lahko razložimo s tem, da imajo pri rastlinah funkcijo zaščite (Terpinc, 2006). V lupini jabolk je več fenolnih snovi, kot v njihovem mesu, kar so dognali v raziskavi Veberič in sod. (2005).

Ta fiziološka funkcija zaščite je celo bolj pomembna in učinkovita kot same fizične pregrade (trda lupina, zaščitne ovojnice okoli semen, trnje...). V raziskavi sta Mahoney in Molyneux (2004) ugotavljala, katere snovi v orehih preprečujejo rast glivam, ki tvorijo aflatoksine in ugotovila, da je oreh zelo dobro zaščiten pred njimi, pa ne samo zaradi debele ovojnice, temveč predvsem zaradi fenolnih spojin. Ovojnica se lahko poškoduje in to omogoči glivam, da vstopijo vanjo, vendar jim fenolne snovi preprečujejo rast (Mahoney in Molyneux, 2004).

2.3.1 Funkcija fenolnih spojin

V rastlinah fenoli delujejo kot fitoaleksini, odvrata, vaba za opraševalce, prispevajo k obarvanju rastlin, so antioksidanti in zaščitni dejavniki proti UV svetlobi. V hrani fenoli lahko prispevajo h grenkosti, trpkosti, barvi, okusu, vonju in oksidativni stabilnosti. Fenoli celične stene, kot so lignini in hidrokisicimne kisline, so povezani v različne komponente celic. Te komponente prispevajo k mehanski trdnosti celične stene, ki ima omejitveno vlogo pri rasti rastlin in morfogenezi in v odgovoru celic na stres in patogene (Naczki in Shahidi, 2004).

Kot odgovor na stres naj bi rastline izrabile v celici že prisotne fenolne spojine ali pa zaradi stresa nastale fenolne spojine. Običajni odgovor rastline na stres je povečanje celotnih fenolnih spojin, posebno klorogenske kisline (Abram in Simčič, 1997).

Vsebnost fenolov je močno odvisna od mnogih zunanjih ali okoljskih dejavnikov (stres, temperatura, svetloba) in notranjih (hranila, hormoni). Na vsebnost fenolov v plodovih vpliva tudi upogibanje vej (pri hruškah), npr. za sorto 'Viljamovka' je bolj primerno upogibanje vej v spomladanskem času, saj se zato poveča količina fenolov, kar vpliva na notranjo kakovost plodov. V vejah, ki so jih upognili poleti, se vsebnost fenolov ni povečala (Colarič, 2007).

2.4 IZBIRA TOPILA

Fenole je najprej potrebno pridobiti iz rastlin, preden jih lahko analiziramo. Na ekstrakcijo vpliva kemična narava snovi, metoda ekstrakcije, velikost delcev vzorca, dolžina in razmere skladiščenja, prisotnost motečih snovi (Naczk in Shahidi, 2004).

Po kemični naravi so rastlinski polifenoli enostavni do visoko polimerizirani. Ekstrakti fenolov iz rastlin so vedno mešanica različnih fenolnih razredov, ki so topni v uporabljenih topilih. Topnost je odvisna od tipa topila (polarnost), stopnje polimerizacije fenolov, kot tudi interakcije med fenoli in drugimi sestavinami hrane in tvorbe netopnih kompleksov. Ni enotnega in popolnoma zadovoljivega postopka, ki bi bil ustrezen za ekstrakcijo vseh fenolov določenega razreda fenolnih snovi v rastlinskem materialu. Metanol, etanol, aceton, voda, etilacetat in njihove kombinacije so pogosto uporabljene za ekstrakcijo fenolov (Naczk in Shahidi, 2004).

Topilo izberemo glede na to, katere snovi želimo iz materiala dobiti, to pa je odvisno od kemične sestave spojin in od nadaljne uporabe teh snovi. Močno polarna topila, kot so metanol, etanol, voda, so bolj specifični kot topilo za glikozide - to so nesladkorni deli molekule, povezani s sladkorjem. Flavonoidi so pogosto vezani v aglikone, kar jim povečuje topnost v vodi in zmanjšuje toksičnost (Abram in Simčič, 1997). Benzen, heksan, eter, etilacetat, kloroform, tetrahidrofuran pa so srednje polarna in nepolarna topila, ki se uporabljajo kot topila za proste aglikone (aglikon je nesladkorni del v flavonoidni molekuli) (De Santis in Moresi, 2007).

Lapornik in sod. so v raziskavi izvedli ekstrakcijo različnih materialov (rdeči ribez, črni ribez, grozdje) s tremi različnimi topili: 70 % metanolom, 70 % etanolom in vodo. Metanol in etanol sta pokazala večjo moč za ekstrakcijo kot voda. V vodnih ekstraktih vsebnost polifenolov upada, medtem ko v metanolu in etanolu narašča s časom ekstrakcije. Metanol se je v primerjavi z etanolom izkazal kot boljše topilo za polifenole in antociane, toda razlike niso bile tako velike, zato je etanol za prehrabeno industrijo ustrezno topilo, saj poleg nestrupenosti da dovolj velik izplen polifenolov. Metanol in etanol sta manj polarna od vode, zato sta bolj učinkovita pri uničenju celične stene in semen, ki imajo nepolarni značaj in povzročita, da se polifenoli sprostijo iz celic (Lapornik in sod., 2005).

2.4.1 Alkoholi

Alkoholi vsebujejo funkcionalno skupino -OH vezano na ogljikov skelet, ki je ostanek ogljikovodika. Enako funkcionalno skupino imajo tudi fenoli.

Kolikor daljši je hidrofobni ostanek ogljikovodika, toliko slabše je alkohol topen v vodi. Kolikor več hidrofilnih -OH skupin je v molekuli, toliko bolj so alkoholi topni v vodi (Schröter, 1993). Voda je najbolj polarno topilo. Pravilo glede topnosti spojin je, da se podobno topi v podobnem. V polarnih topilih se raztapljajo snovi, ki imajo polarno zgradbo (Brenčič in Lazarini, 1997). Topnost alkoholov v vodi je odvisna od polarnosti in nepolarnosti alkoholov. Če je alkohol nepolaren, je slabo topen v vodi, če pa je polaren je v

vodi dobro topen. Dodaten pogoj za topnost alkoholov v vodi je tudi tvorba vodikovih vezi med alkoholom in vodo. Če se vezi tvorijo, je topnost boljša (Alkohol, 2002).

Nižji alkoholi, kamor spadata metanol in etanol, se mešajo z vodo v vseh razmerjih in prav tako kot voda raztapljajo številne ionske in polarne topljence (Kemija, 2001/02).

Metanol in etanol sta polarni topili, ki smo ju uporabili v naši raziskavi.

Metanol ima molekulsko formulo CH_3OH . Je zelo strupen, v manjših količinah povzroča slepoto, v večjih je smrten. Spada med najpomembnejše produkte kemijske industrije in se uporablja za pridobivanje formaldehida, ki je surovina za akrilne plastične mase in očetno kislino, topilo za lake in barve. Razen tega ga uporabljajo za metiliranje, za denaturacijo etanola in za pogonsko gorivo (Schröter, 1993). Metanol je topen v vodi, se meša z njo v vseh razmerjih (Alkoholi, 2008).

Molekulska formula etanola je $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Pridobivajo ga z alkoholnim vrenjem sladkorja, lahko tudi z predelavo škroba in celuloze iz krompirja, koruze ali lesa ali s hidriranjem etena. Uporablja se za pijače, kot konzervans v prehrambeni industriji, kot topilo, v kemijski industriji pa za pridobivanje mnogih estrov (Schröter, 1993). Etanol je topen v vodi in se meša z njo v vseh razmerjih (Alkoholi, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Uporabili smo mlade, zelene plodiče dveh sort oreha, ki še niso imeli lignificirane luščine. Sorti, ki smo ju uporabili sta bili slovenska sorta 'Elit' in francoska sorta 'Franquette'. Obe sorti sta primerni za gojenje v Sloveniji, kjer je glavni problem spomladanska pozeba, ki se ji ti dve sorti uspešno izogneta.

Plodiče smo nabrali leta 2005 v kolekcijskem nasadu Biotehniške fakultete v Mariboru, na Raziskovalnem polju za lupinarje. Nabrani so bili 30. 6. 2005 (1. termin) in 7. 7. 2005 (2. termin).

3.1.1 Sorta 'Elit'

Sorta 'Elit' je domača sorta, selekcija Zavoda za sadjarstvo Maribor. Je potomec neke francoske sorte iz okolice Grenobla, v šestdesetih letih selekcionirana v Mariboru.

Drevo ima bujno rast, krošnja je v mladosti precej pokončna, pozneje pa dobi okroglo in odprto obliko. Olista se konec prve dekade maja, tako da se izogne spomladanski pozebi. Za bolezen bakterijski ožig orehov (črna pegavost), ki jo povzroča bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* so občutljivi le mladi bujno rastoči poganjki, proti orehovi rjavi pegavosti - antraknoza (*Gnomonia leptostyla*) pa je skoraj popolnoma odporna. Je delno samooplodna. Obrodi zgodaj, rodi redno in zadovoljivo (Črnko, 1990).

Za sorto 'Elit' je značilno, da že drugo ali tretje leto po sajenju razvije ženske cvetove, kmalu zatem pa še moška socvetja. Pridelek v mladem nasadu je tako večji kot pri drugih sortah. Zaradi zgodnje diferenciacije pa se rast ob neustrezni prehrani in nedoslednem izvajanju gojitvene rezi zaustavi, še preden drevo razvije veliko krošnjo. V takem primeru je pridelek pri odraslem drevesu sorte 'Elit' manjši, kot mu omogoča njegov genetski potencial (Solar in Štampar, 2004).

3.1.2 Sorta 'Franquette'

'Franquette' izvira z območja Isere v Franciji. Je stara francoska sorta, močno razširjena v svetu. Brsti po prvem maju. Je srednje bujne, nekoliko pokončne rasti. Odporna je proti pozebi in proti orehovi rjavi pegavosti (*Gnomonia leptostyla*) in malo občutljiva na bolezen bakterijski ožig orehov (črna pegavost), ki jo povzroča bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. Rodi redno in dobro. Plod je srednje velik (9,5 - 12 g), jedrce je zelo svetlo, odlično zapolnjuje luščino in se zlahka izlušči. Kot dobro rodna in proti mrazu odporna sorta je primerna za gojenje v intenzivnih nasadih v kontinentalnih predelih Slovenije (Črnko, 1990).

3.2 METODA DELA

3.2.1 Priprava vzorca in ekstrakcija fenolov iz zelenih plodičev oreha

Za vzorec smo nabrali zelene plodiče dveh sort orehov, 'Elit' in 'Franquette', v dveh različnih terminih (30. 6. 2005 in 7. 7. 2005). Prepeljani so bili iz Maribora iz kolekcijskega nasada in smo jih še isti dan uporabili za pripravo ekstraktov.

V terilnici smo s pomočjo tekočega dušika zmleli sveže plodove oreha. Zatehtali smo 0,1 g vzorca in prelili s 5 ml ekstrakcijske raztopine (MeOH z 1 % BHT ali EtOH z 1 % BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol). Ekstrahirali smo 45 min v ultrazvočni kopeli (pri 4 °C). Nato smo ekstrakt centrifugirali 7 min pri 10000 obratih na minuto. Prefiltrirali smo ga skozi poliamidni filter Chromafil® AO-45/25 (Macherey-Nagel) s premerom por 0,45 µm v vialo za HPLC analizo.

Vzorci zelenih plodičev dveh sort orehov, 'Elit' in 'Franquette', smo pripravili z dvema različnima topiloma, metanolom in etanolom. Nabrali in ekstrahirali smo jih v dveh terminih (30. 6. 2005 in 7. 7. 2005). Skupno smo pripravili 24 vzorcev. V vsakem od terminov smo jih pripravili 12. Za sorto 'Elit' smo pripravili vzorec z metanolom in vzorec z etanolom. Prav tako pa tudi za sorto 'Franquette'. V vsakem terminu pa smo za vse štiri vzorce naredili po tri ponovitve.

3.2.2 Analiza fenolov s HPLC

Kromatografska analiza je postopek, kjer ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo.

Pri HPLC molekule vzorca na poti skozi kolono prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le z mobilno fazo, v stacionarni fazi pa mirujejo. Pri adsorpcijski in reverzni kromatografiji se stacionarna in mobilna faza ločita v polarnosti pri ionski izmenjalni kromatografiji pa se ločita na osnovi njunega električnega naboja. Pri tem pride do različne porazdelitve določenih komponent med obe fazi, zaradi česar različne komponente vzorca različno dolgo potujejo skozi kolono. Retencijski čas je definiran kot čas, ki ga komponenta prebije v koloni (Žorž, 1991). Ta je značilen za določeno komponento in ga pri konstantnem pretoku lahko uporabimo za njeno identifikacijo. Detektor kontinuirano zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono in rekorder zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov.

Analize fenolnih snovi s HPLC smo opravili na Katedri za sadjarstvo, na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Vzorci smo analizirali s HPLC sistemom Thermo Finnigan Surveyor s kvarterno črpalko, detektorjem photodiode array detector (PDA detektor), analitsko kolono Chromsep HPLC

column SS (250x 4,6 mm, Hypersil 5 ODS) s predkolono Chromsep guard column SS (10x 3 mm) (Chrompack, Nizozemska) in programsko opremo ChromQuest™ 4,0 za Windows 2000.

Analizirali smo pod kromatografskimi pogoji povzetimi po Schieber in sod. (2001): volumen injeciranega vzorca: 20 µl, hitrost pretoka mobilne faze: 1 ml/min in delovna temperatura kolone: 25 °C.

Ločevanje fenolnih snovi je potekalo z mešanjem dveh mobilnih faz: topilo A je bila 2 % očetna kislina v bidestilirani vodi, topilo B pa je bila 0,5 % očetna kislina v bidestilirani vodi z acetonitrilom v razmerju 1:1 (v/v). Razmerje med mobilnima fazama A in B se je v tem času gradientno spreminjalo: iz začetnih 90 % topila se je njegova vsebnost po 50 minutah zmanjšala na 45 % po 60 minutah je bila 0 % in nato po 65 minutah narasla zopet na 90 %. Analiza posameznega vzorca je trajala 65 minut. Med vsako analizo pa je bila izvedena izenačitev razmer kromatografije z 90 % topila A za 15 minut.

Detekcija fenolnih spojin je potekala pri valovni dolžini 280 nm. Posamezne fenolne spojine smo kvalitativno določili s primerjavo retencijskih časov, absorpcijskih maksimumov v UV spektru in z dodatki standardne raztopine vzorcu. Koncentracijo posamezne fenolne spojine pa smo izračunali na osnovi primerjave površine vrhov na kromatografu standardne raztopine in vzorca.

3.2.3 Kemikalije

Uporabljene so bile kemikalije za HPLC analizo. Za določanje fenolnih snovi smo uporabili naslednje standarde: galno kislino proizvajalca Merck Kga (Darmstad, Nemčija); klorogensko kislino, sinapinsko kislino, elagno kislino proizvajalca Sigma Chemical Co; (+)-katehin proizvajalca Carl Roth; juglon od Sigma-Aldrich Chemie GmbH. BHT, ki smo ga uporabili je bil od Sigma Chemical Co, metanol in etanol, ki smo ju uporabili za pripravo vzorcev pa od Merck Kga. Voda, ki smo jo uporabili za pripravo vzorcev, raztopine in analize je bila bidestilirana in očiščena v Milli-Q vodnem čistilnem sistemu proizvajalca Millipore.

3.2.4 Statistična obdelava podatkov

Zbrane podatke smo tabelarično uredili v programu Microsoft Excel in jih statistično obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) s pomočjo programa Statgraphics Plus for Windows 4.0. Razlike med obravnavanji smo testirali s t-testom pri tveganju $p < 0,05$.

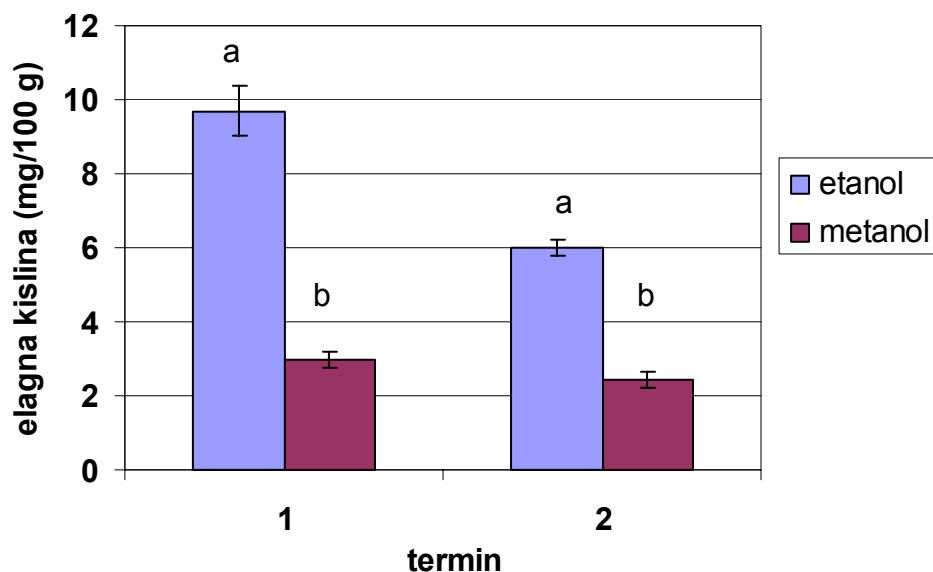
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VSEBNOST FENOLOV

Proučevali smo ali obstaja kakšna razlika v ekstrakciji zelenih orehovih plodičev z dvema različnima topiloma, metanolom in etanolom. Vzorce smo pripravili iz plodičev dveh sort orehov, ki smo jih nabirali v dveh terminih. Prvi termin je bil 30. 6. 2005, drugi termin pa je bil 7. 7. 2005. Rezultate analize vsebnosti izločenih fenolnih snovi, v metanolu in etanolu, smo statistično obdelali in jih predstavljamo v tabelarični in grafični obliki. Fenolne snovi, ki smo jih določili so bile: elagna kislina, galna kislina, juglon, (+)-katehin, klorogenska kislina in sinapinska kislina. Vsebnost fenolnih snovi smo podali v mg/100 g sveže mase plodov.

4.1.1 Elagna kislina

Elagna kislina je polifenol, ki ga najdemo v različnem sadju in oreških, v jagodah, orehih, grozdju, črnem ribezu (Priyadarsini in sod., 2002). V orehih jo najdemo v velikih količinah. Raziskave na živalih so pokazale, da dobro vpliva na preprečevanje nastanka raka, saj vpliva na začetek delovanja in razstrupljanje potencialnih rakotvornih snovi (Pratt in Matthews, 2004).



Slika 2: Povprečna vsebnost elagne kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

Za ta polifenol se izkaže, da je etanol ustrežnejše topilo kot metanol, kar smo ugotovili v naši raziskavi, saj je bila vsebnost elagne kisline večja v etanolu kot v metanolu. Rezultati so bili statistično značilni. Vsebnost elagne kisline se je med prvim in drugim terminom zmanjšala. To kažejo tudi rezultati raziskave (Solar in sod., 2006), ki so raziskovali

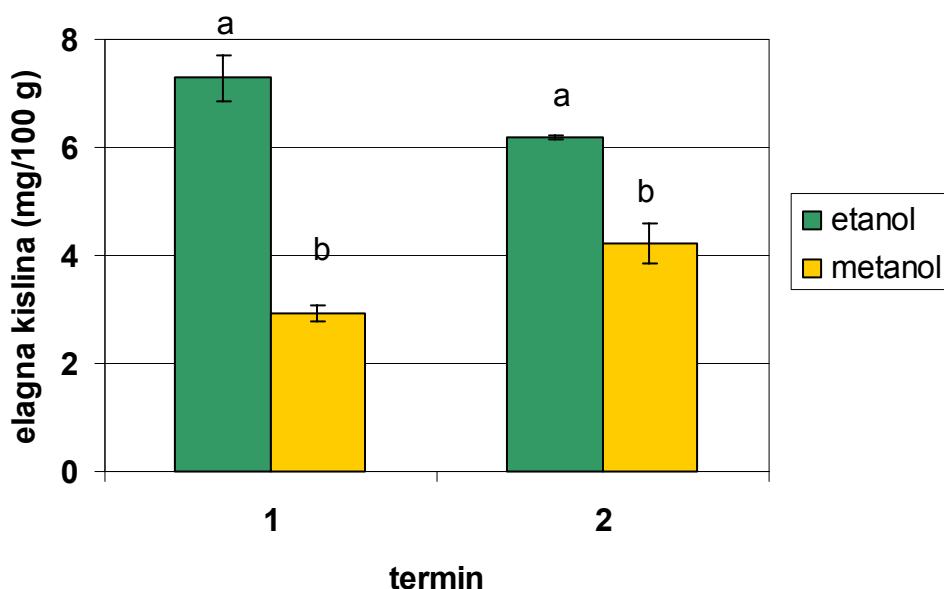
vsebnost fenolov v enoletnih poganjkih orehov. V enoletnih poganjkih sorte 'Elit' je bila največja maja in junija, potem pa se je začela zmanjševati.

Vsebnost elagne kisline pri sorti 'Franquette' (slika 2), ki smo jo v naši raziskavi pridobili z etanolno ekstrakcijo, je bila v prvem terminu večja kot v drugem. Z metanolno ekstrakcijo pa smo v obeh terminih pridobili podobno količino elagne kisline. Ugotovili smo, da je bila vsebnost elagne kisline večja v etanolu kot v metanolu. To velja za oba termina. Med ekstrakcijo v etanolu in metanolu obstaja statistično značilna razlika. Vsebnost elagne kisline je pri sorti 'Franquette', v času od prvega do drugega termina nabiranja plodičev, upadla.

Pri sorti 'Elit' (slika 3) je bila vsebnost elagne kisline, izločene v etanolu, v prvem terminu prav tako večja, medtem, ko je bila v metanolu večja ob drugem terminu. Med topili obstajajo statistično značilne razlike, več elagne kisline se je izločilo v etanolu, kot v metanolu.

Če primerjamo obe sliki, vidimo, da z etanolom pri obeh sortah pridobimo več elagne kisline. Ti rezultati se skladajo z rezultati raziskave (Pinto in sod., 2007), kjer metanol prav tako ni bil ustrezno topilo za elagno kislino, saj je bil najmanj uspešen med vsemi uporabljenimi topili.

Na obeh slikah prav tako lahko opazimo, da je vsebnost elagne kisline pri obeh sortah najvišja v prvem terminu, do drugega termina pa upade.

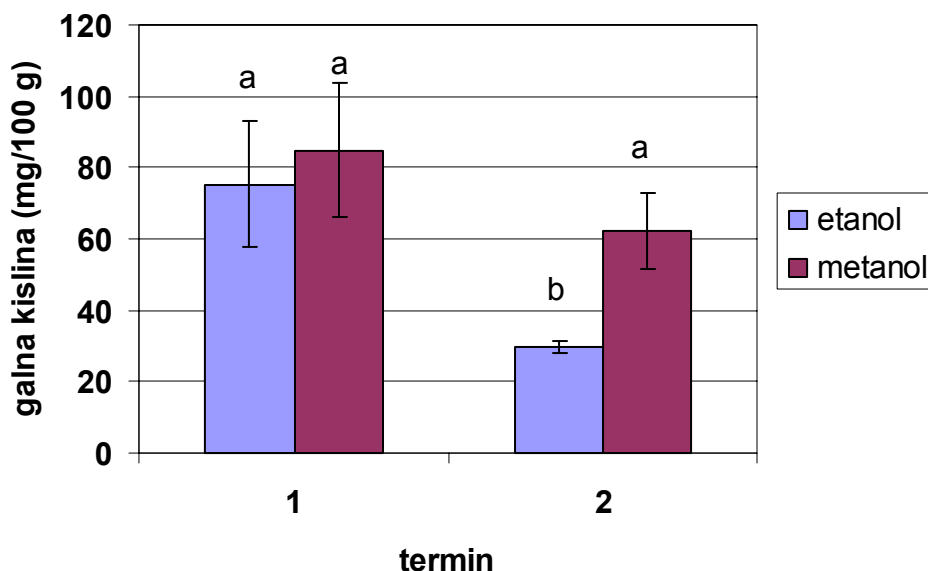


Slika 3: Povprečna vsebnost elagne kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

4.1.2 Galna kislina

Ugotovili smo, da je za galno kislino metanol ustrežnejše topilo. Poleg juglona, je vsebnost galne kisline največja med vsemi fenolnimi snovmi, ki smo jih proučevali, kar se sklada z rezultati drugih raziskav (Štampar in sod., 2006; Jakopič in sod., 2006). Jakopič in sod. (2006) so ugotovili, da obstaja razlika med sortami. Galne kisline je več v sorti 'Franquette', kar se je izkazalo tudi v naši raziskavi. Njena vsebnost je desetkrat večja od vsebnosti drugih fenolnih snovi (razen juglona), kar smo ugotovili tudi mi.

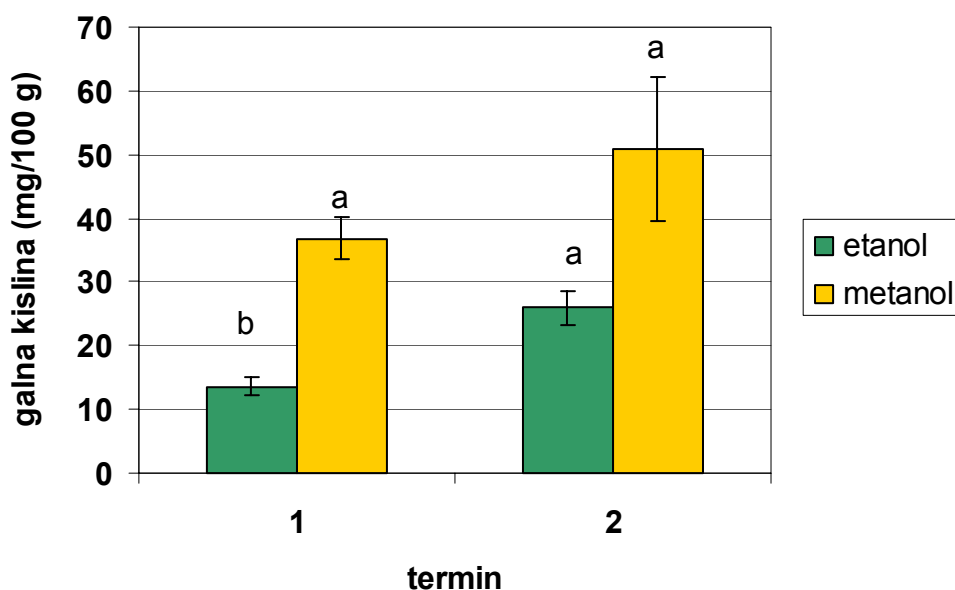
Tudi raziskava o fenolnih snoveh v grozdnih jagodah je pokazala, da obstaja razlika v količini galne kisline med različnimi sortami trte (Yilmaz in Toledo, 2004). Proučevali so tri sorte grozdja 'Muscadine', 'Chardonay' in 'Merlot', katerih semena so vsebovala 99 mg/100 g, 15 mg/100 g in 10 mg/100 g galne kisline. Kožica jagod sort 'Chardonay' in 'Merlot' pa je vsebovala 5 mg/100 g in 3 mg/100 g galne kisline.



Slika 4: Povprečna vsebnost galne kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

Rezultati naše raziskave za sorto 'Franquette' (slika 4) kažejo, da obstaja razlika v ekstrakciji z različnimi topili le v drugem terminu. Z metanolno ekstrakcijo smo pridobili večjo količino galne kisline, kot z etanolom. Vsebnost galne kisline je pri sorti 'Franquette' večja v prvem terminu, potem pa se začne zmanjševati.

Pri sorti 'Elit' (slika 5) pa se rezultati o ekstrakciji galne kisline z etanolom in metanolom razlikujejo le v prvem terminu, medtem ko je za drugi termin vseeno katero topilo uporabimo. Večjo količino galne kisline v prvem terminu smo pridobili z metanolom. Vsebnost galne kisline je pri sorti 'Elit' večja v drugem terminu, ravno obratno kot pri sorti 'Franquette'.



Slika 5: Povprečna vsebnost galne kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

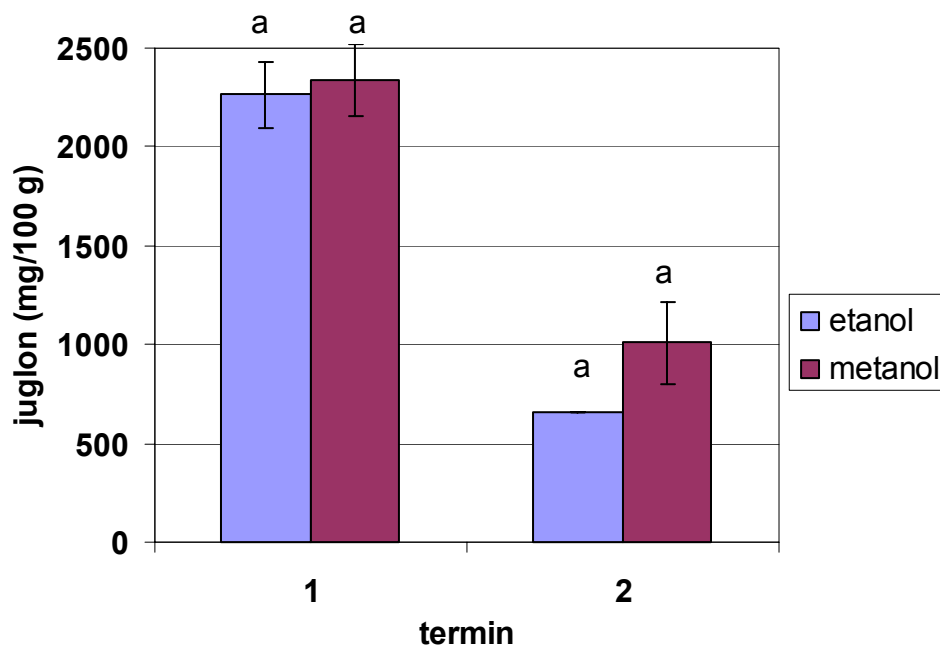
Če primerjamo obe sliki vidimo, da je metanol bolj ustrezno topilo za galno kislino, saj smo pri obeh sortah z njim pridobili več tega fenola, kot z etanolom. Največjo vsebnost galne kisline smo pridobili iz sorte 'Franquette'.

4.1.3 Juglon

Juglon je najbolj značilen fenol v vseh zelenih in rastočih delih orehovitih dreves in zelenih plodičih. Spada med kinone in je pomemben v obrambni funkciji proti patogenim organizmom. V zelenih lupinah orehov je vezan kot glikozid, ki se iz poškodovanih lupin sprosti s pomočjo encimske (in kemične) hidrolize (Buttery in sod., 2000). Na zraku hitro polimerizira do rjavih in črnih barvil.

Rezultati naše raziskave so statistično značilni le za sorto 'Elit', kjer smo največ juglona pridobili z metanolno ekstrakcijo. Vsebnost juglona je bila največja med vsemi fenolnimi snovmi, ki smo jih preučevali. Količina tega fenola v zelenih plodičih ustreza raziskavi Štamparja in sod. (2006), ki so ugotovili podobne količine: 2200 mg/100 g suhe mase pri sorti 'Franquette' in 1400 mg/100 g pri sorti 'Elit'.

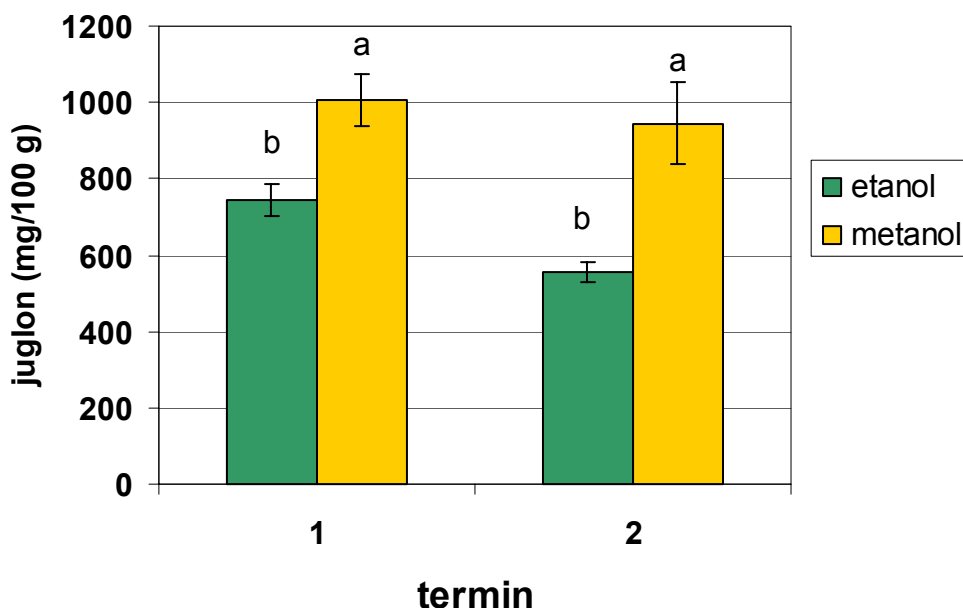
Pri sorti 'Franquette' (slika 6) med rezultati ekstrakcije z različnima topiloma ne obstajajo statistično značilne razlike. V prvem terminu se izloči veliko večja količina juglona, kot v drugem terminu.



Slika 6: Povprečna vsebnost juglona \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

Pri sorti 'Elit' (slika 7) smo dobili večjo količino juglona pri ekstrakciji z metanolom. Statistično značilna razlika med topili obstaja, metanolna ekstrakcija je bolj primerna, saj z njo pridobimo več juglona. Količina juglona je med prvim in drugim terminom rahlo upadla.

Vsebnost juglona je največja med vsebnostmi fenolnih snovi, ki smo jih proučevali. Rezultati kažejo, da je vsebnost juglona od prvega do drugega termina upadla, kar je zelo opazno pri sorti 'Franquette', ki vsebuje tudi veliko večjo količino tega fenola, kot sorta 'Elit'. Primerjava obeh slik pokaže, da je metanol ustreznejše topilo za juglon pri sorti 'Elit' saj smo ga pridobili večjo količino, kot z etanolno ekstrakcijo. Pri sorti 'Franquette' pa kaže da sta obe topili enako učinkoviti, saj se količina juglona, pridobljenega z ekstrakcijo z enim ali drugim topilom ne razlikuje bistveno.



Slika 7: Povprečna vsebnost juglona \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih toplilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

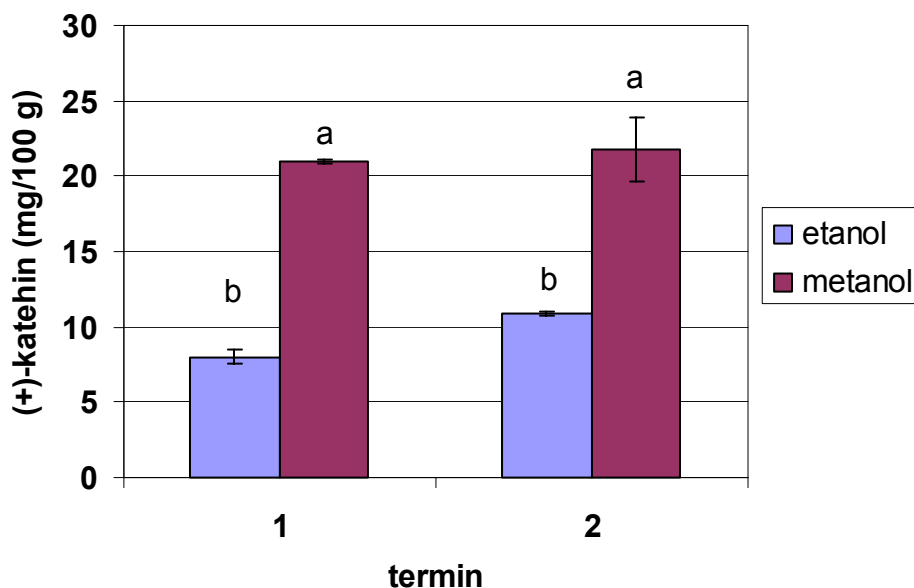
4.1.4 (+)-katehin

Katehini spadajo med flavonoide. So brezbarvne komponente, ki so v rastlinah široko zastopani. Njihova največja vsebnost je v čaju. Velike vsebnosti (+)-katehina so tudi v čokoladi, odkrili pa so jih tudi v kožici arašidov (Yu in sod., 2005). Zapisali so, da katehini pomagajo pri zniževanju LDL holesterola in znižujejo tveganje za nastanek raka in bolezni srca in ožilja. Tudi Lapornik (2005) opisuje katehine kot snovi z močno antioksidativno aktivnostjo, antikarcenogenim, antimutagenim, antimikrobnim in antialergičnim delovanjem. Tudi zeleni plodiči oreha vsebujejo katehine. Količina tega fenola, ki smo jo pridobili v naši raziskavi je podobna količinam, ki so jih pridobili v raziskavi Štampar in sod. (2006).

V raziskavi Yilmaz in Toledo (2004) so odkrili, da je v grozdju veliko (+)-katehina. Iz pešk sort 'Muscadine', 'Chardonay' in 'Merlot' so pridobili 12 mg/100 g, 358 mg/100 g in 127 mg/100 g tega fenola. Iz kožice grozdnih jagod sort 'Chardonay' in 'Merlot' pa so pridobili 60 mg/100 g in 16 mg/100 g (+)-katehina.

Raziskovali so koliko (+)-katehina vsebuje čokolada (Tokusoglu in Ünal, 2002). V temni in mlečni čokoladi različnih proizvajalcev so odkrili od 11 do 72 mg/100 g (+)-katehina. V črnem grozdju (*Vitis vinifera*) je količina katehina 20 mg/100 g, bobu (*Vicia faba* L.) 49

mg/100 g, brusnicah (*Vaccinium oxycoccus* L.) 4 mg/100 g in v rozinah je količina katehina 4 mg/100 g.

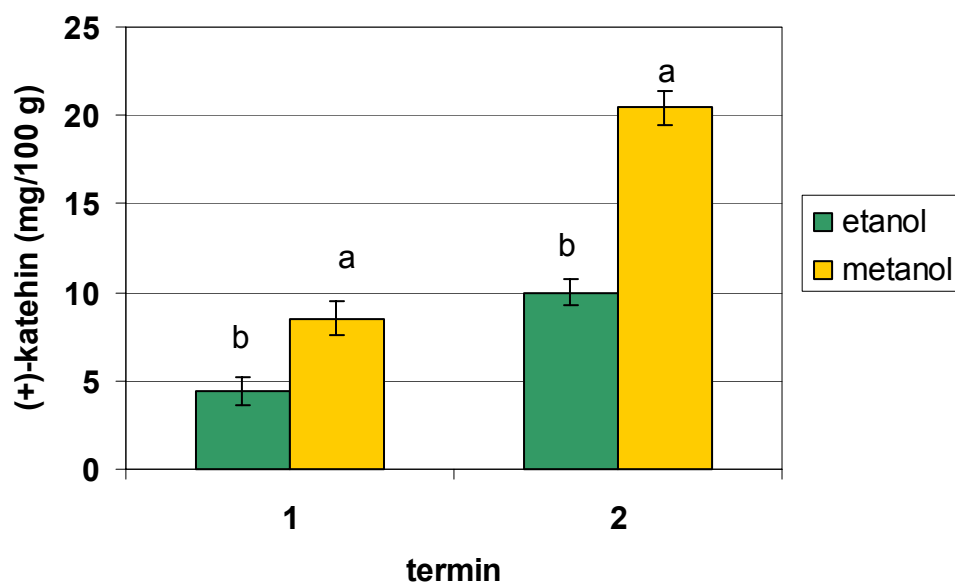


Slika 8: Povprečna vsebnost (+)-katehina \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

Pri sorti 'Franquette' (slika 8) med topili obstajajo statistično značilne razlike. Metanol se je izkazal kot uspešnejše topilo za (+)-katehin. Količina tega fenola med prvim in drugim terminom rahlo naraste.

Pri sorti 'Elit' (slika 9) je metanol prav tako bolj uspešno topilo za ekstrakcijo (+)-katehina. Količina (+)-katehina se spreminja, v prvem terminu smo ga pridobili manj kot v drugem terminu.

(+)-katehin smo pri obeh sortah bolj uspešno pridobili z metanolno ekstrakcijo. Med sortami ni velike razlike v vsebnosti (+)-katehina. Vsebnost (+)-katehina se je pri obeh sortah med prvim in drugim terminom povečala, kar je bolj opazno pri sorti 'Elit'.



Slika 9: Povprečna vsebnost (+)-katehina \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

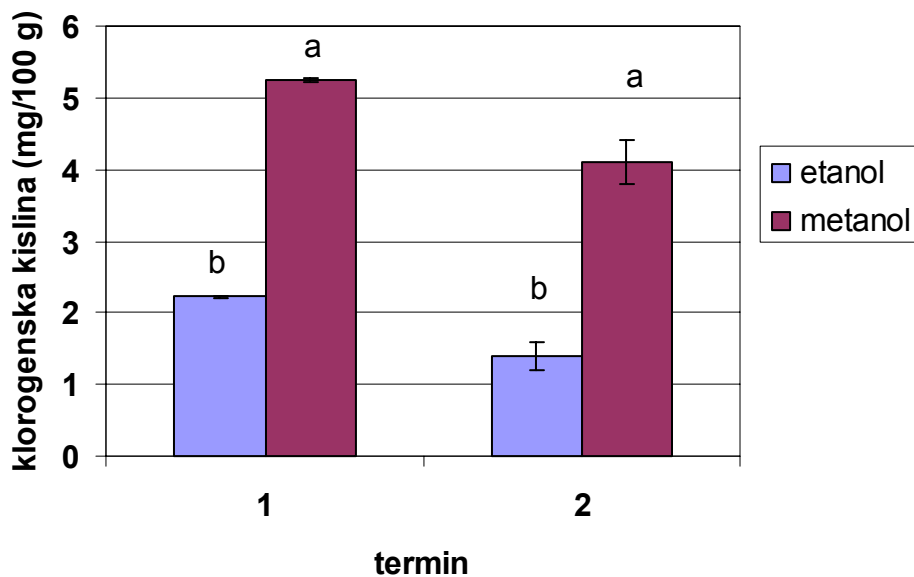
4.1.5 Klorogenska kislina

Klorogenska kislina spada med hidroksicimetine kisline in naj bi bila najpomembnejša izmed cimetnih kislin, ki jih dobimo v sadju. Cimetne kisline se nalagajo v lupini plodov (Macrae in sod., 1993). Najdemo jo v jabolkih, hruškah, breskvah, marelicah, češnjah, slivah, borovnicah, krompirju (Rice-Evans in sod., 1996). V borovnicah jo je 25 % suhe mase plodov (Macrae in sod., 1993). V jabolkih so jo pridobili 27 mg/100 g, v ekološko pridelanih plodovih sorte 'Bobovec' pa celo do 79,5 mg/100 g (Veberič in sod., 2005).

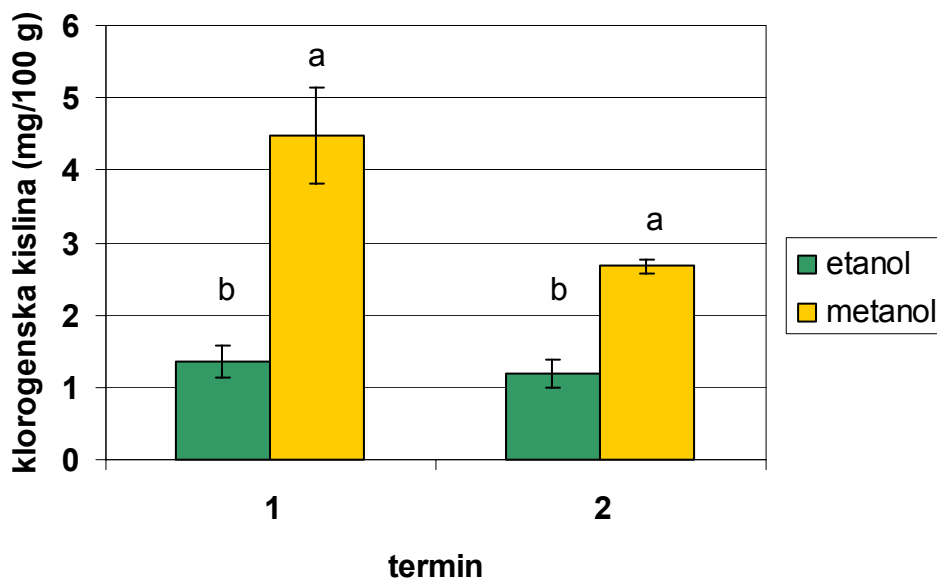
Orehovi plodiči vsebujejo precej manjše količine klorogenske kisline, ki jo z metanolno ekstrakcijo pridobimo več kot z etanolom.

Če pogledamo naše rezultate vidimo, da med topili, pri sorti 'Franquette' (slika 10), obstajajo statistično značilne razlike in sicer smo več klorogenske kisline pridobili z metanolom. Vsebnost klorogenske kisline, se med prvim in drugim terminom rahlo zmanjša, največ smo jo pridobili v prvem terminu.

Pri sorti 'Elit' (slika 11), smo večjo količino klorogenske kisline pridobili z metanolno ekstrakcijo. Več klorogenske kisline smo pridobili v prvem terminu, nato pa se je količina do drugega termina zmanjšala.



Slika 10: Povprečna vsebnost klorogenske kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

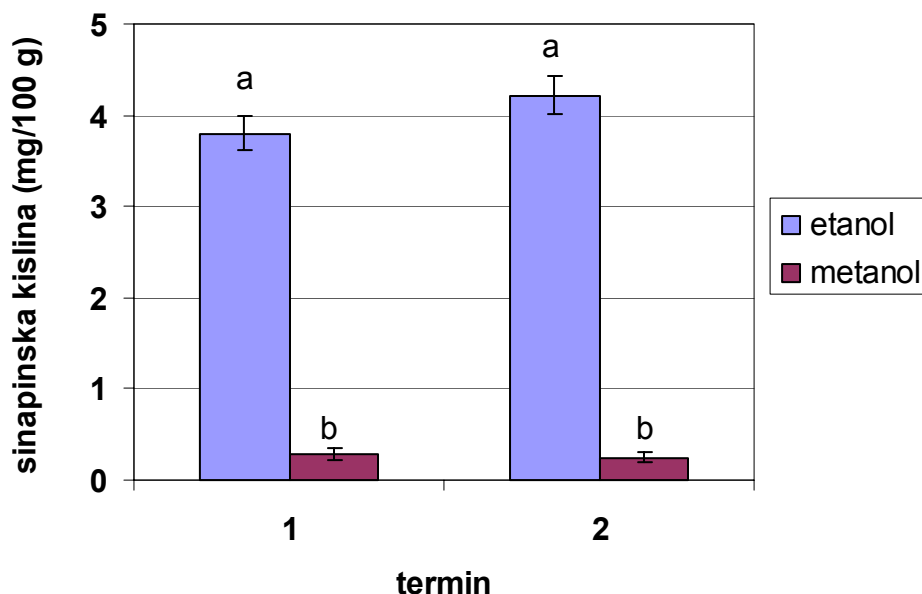


Slika 11: Povprečna vsebnost klorogenske kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

Če primerjamo obe sliki, vidimo, da z metanolom pridobimo več klorogenske kisline. Večja vsebnost klorogenske kisline, pri obeh sortah, je bila pridobljena v prvem terminu, potem se je do drugega termina zmanjšala.

4.1.6 Sinapinska kislina

Sinapinska kislina spada med hidroksicimetne kisline, ki pa jo le redko najdemo v sadju in je običajno le v sledovih. V majhnih količinah jo najdemo v nekaterih citrusih, ananasu, paradižniku (Macheix in sod., 1990). Raziskovali so vsebnost sinapinske kisline v peškah in olupkih različnih citrusov (Bocco in sod., 1998). Največjo količino sinapinske kisline je vseboval olupek in sicer 95,4 mg/100 g, semena so vsebovala do 6,9 mg/100 g, sinapinske kisline.

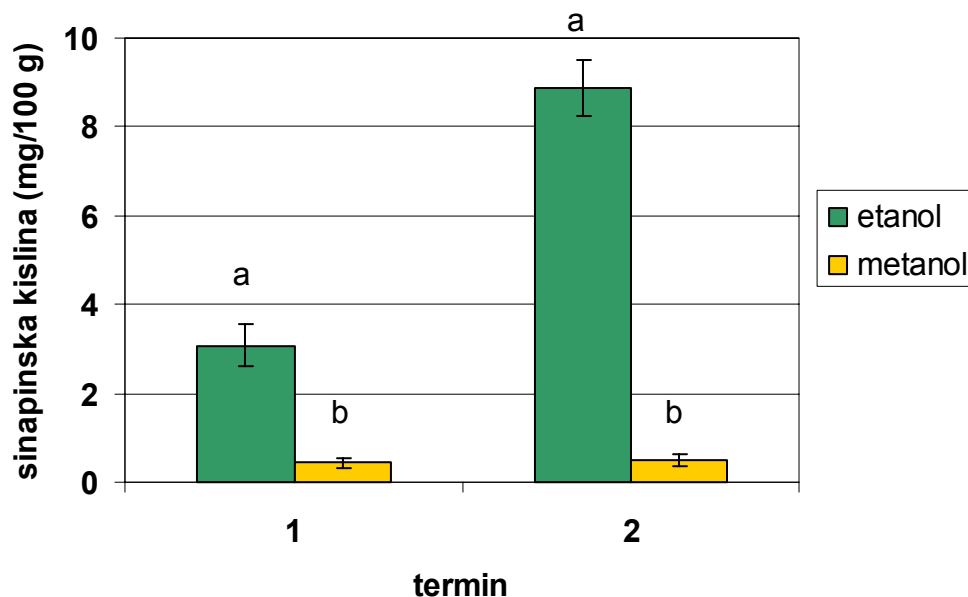


Slika 12: Povprečna vsebnost sinapinske kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Franquette' v dveh različnih topilih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

Med topili metanol in etanol obstajajo statistično značilne razlike. Iz slike (slika 12) vidimo, da je topilo etanol bolj uspešno za ekstrakcijo sinapinske kisline, iz sorte 'Franquette'. Pri tej sorti je količina izločene sinapinske kisline, v obeh terminih, skoraj enaka.

Tudi pri sorti 'Elit' (slika 13), je bil etanol bolj uspešno topilo za ekstrakcijo sinapinske kisline. V drugem terminu se je v etanolu izločilo veliko več, kot v prvem terminu. Z metanolom smo jo pridobili zelo majhno količino.

Če primerjamo obe sorti, ugotovimo, da je etanol bolj ustrezno topilo za sinapinsko kislino, kot metanol. V metanolu se je ekstrahiralo zelo malo. Količina sinapinske kisline pri sorti 'Franquette' se ne spreminja veliko, medtem ko pri sorti 'Elit' med prvim in drugim terminom količina sinapinske kisline zelo naraste.



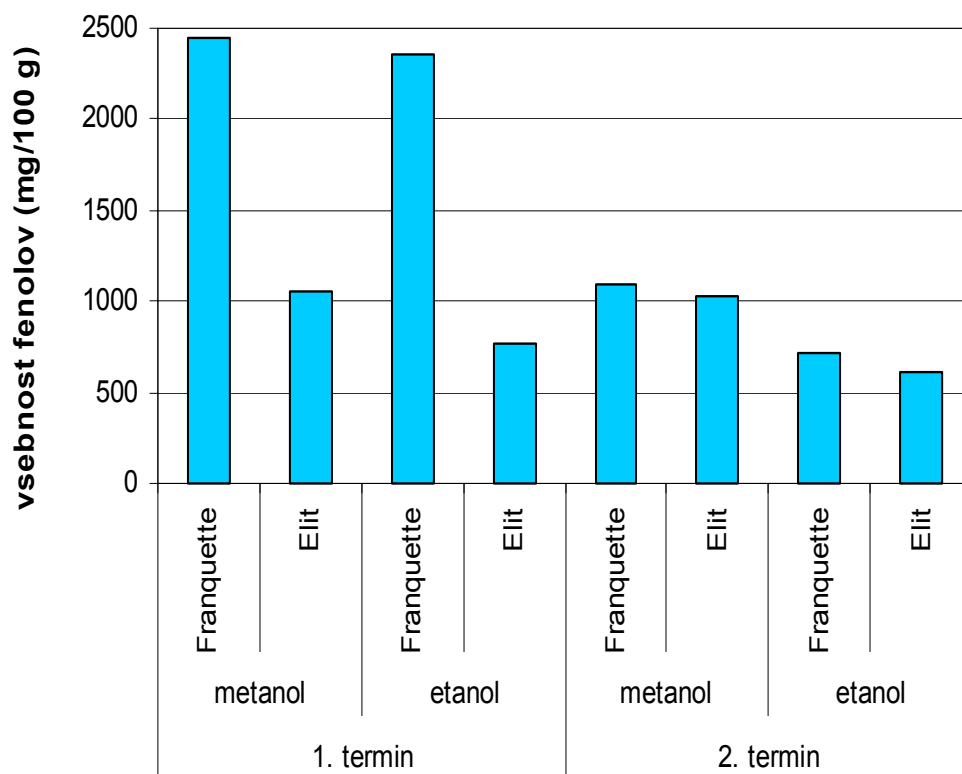
Slika 13: Povprečna vsebnost sinapinske kisline \pm standardna napaka v mg/100 g ekstrakta pri sorti oreha 'Elit' v dveh različnih toplih in dveh terminih. Ista črka (a,b) pomeni, da pri pripadajočih obravnavanjih ni statistično značilnih razlik med povprečji, pri $p < 0,05$.

4.1.7 Skupna količina ekstrahiranih fenolnih snovi

V primerjavi uspešnosti dveh topil, metanola in etanola lahko na sliki 14 opazimo, da je ekstrakcija z metanolom bolj uspešna od etanolne ekstrakcije, saj z metanolom pridobimo večjo količino skupnih fenolov. To topilo, se je v naši raziskavi izkazalo kot bolj uspešno za pridobivanje večjih količin večine fenolnih snovi. Tudi v raziskavah Lafka in sod. (2007), kjer so proučevali vpliv topil na pridobivanje fenolnih snovi iz grozdnih kožic in pečk, ter Lapornik in sod. (2005), ki so proučevali vpliv topil pri ekstrakciji rdečega, črnega ribeza in grozdja, se je metanol, če so ga primerjali z etanolom, izkazal za bolj uspešno topilo.

Če pogledamo posamezno sorto, razlika v količini pridobljenih fenolnih snovi z dvema različnima topiloma pri sorti 'Franquette' v prvem terminu ni tako očitna, saj se je v etanolu in metanolu, izločila skoraj enaka količina fenolnih snovi.

Vidimo, da v količini fenolnih snovi med sortama obstajajo precejšnje razlike. Največjo količino fenolnih snovi, smo pridobili z metanolno ekstrakcijo plodičev sorte 'Franquette', ki v prvem terminu vsebuje zelo veliko količino fenolnih snovi v primerjavi s sorto 'Elit'.



Slika 14: Skupna količina izločenih fenolnih snovi v metanolu in etanolu, pri dveh sortah oreha 'Elit' in 'Franquette' in v dveh različnih terminih.

Pri obeh sortah, se je največ fenolnih snovi izločilo v prvem terminu, vendar pri sorti 'Elit' to ni tako opazno, saj je količina izločenih fenolnih snovi v obeh terminih podobna, medtem ko je pri sorti 'Franquette' vsebnost fenolov v prvem terminu zelo visoka, potem pa do drugega termina zelo upade.

Kot najbolj primeren čas za nabiranje plodičev predlagamo prvi termin, ko smo pridobili največ fenolnih snovi, priporočamo pa sorto 'Franquette', ki vsebuje več fenolnih snovi kot sorta 'Elit'. Tudi v raziskavi Štampar in sod. (2006) so ugotovili, da je termin obiranja ob koncu junija najprimernejši, saj takrat pridobimo največ fenolnih snovi. Ta datum tudi sovпада z datumom, ko se tradicionalno nabira zelene orehe za pripravo orehovca.

Prvi termin je najbolj primeren za nabiranje in ekstrakcijo plodičev sorte 'Franquette', saj takrat skoraj ni razlike med topili in je vseeno katero uporabimo - obe sta enako učinkoviti. Za pripravo orehovca je etanol ustrezno topilo, kajti če upoštevamo vpliv sorte in rastne dobe na količino fenolnih snovi v plodičih, lahko z etanolno ekstrakcijo pridobimo podobno količino fenolnih snovi kot z metanolom.

5 SKLEPI

V diplomskem delu smo proučevali kakšne so razlike med topili, metanolom in etanolom, ki smo ju uporabili za ekstrakcijo fenolnih snovi.

Ugotovili smo naslednje:

- ❖ Etanol je ustrežnejše topilo za elagno in sinapinsko kislino, metanol pa je ustrežnejši za ekstrakcijo (+)-katehina in klorogenske kisline. Metanol je prav tako bolj primerno topilo za juglon, vendar le pri sorti 'Elit'.
- ❖ Vsebnost fenolnih snovi v plodičih je sortno specifična.
- ❖ Termin nabiranja mladih plodičev, vpliva na količino fenolnih snovi.
- ❖ Vsebnost fenolnih snovi pridobljenih iz nezrelih plodičev sorte 'Franquette' v prvem terminu, je veliko večja kot v drugem terminu. Večja je tudi v primerjavi s količino pridobljenih fenolnih snovi iz sorte 'Elit'.
- ❖ V prvem terminu pri sorti 'Franquette' ne obstaja bistvena razlika med topili. V tem terminu dobimo tudi največjo možno količino fenolnih snovi, zato je ta termin najbolj primeren za nabiranje in ekstrakcijo plodičev sorte 'Franquette'.
- ❖ Pri sorti 'Elit' obstaja razlika med topili. Več fenolnih snovi smo pridobili z metanolom.
- ❖ Z metanolom smo pridobili več fenolnih snovi, kot z etanolom.

Sklep, ki potrди našo hipotezo, da obstaja razlika med topili je, da razlika res obstaja, boljše topilo je metanol, saj smo z njim pridobili največjo količino skupnih fenolov. Vendar je metanol alkohol, primeren za laboratorijske raziskave, ni pa primeren za uživanje, saj je strupen. Zato ga ne smemo uporabiti za pripravo alkoholnih pijač. (Kemija za študente agronomije, 2008)

Obstaja tudi razlika med sortama v količini fenolnih snovi in sicer smo več fenolov pridobili iz sorte 'Franquette'. Sorti 'Franquette' in 'Elit' se razlikujeta tudi po tem, da količina fenolnih snovi pri sorti 'Franquette' med prvim in drugim terminom naglo upade, pri sorti 'Elit' pa ostaja bolj ali manj konstantna.

6 POVZETEK

Oreh je drevo, ki je bilo pogosto zasajeno na kmečkem dvorišču slovenskih kmetij. Iz zelenih plodičev oreha so pridelovali alkoholno pijačo orehovec. V naši raziskavi smo z dvema različnima topiloma, metanolom in etanolom ekstrahirali zelene plodiče dveh sort oreha, 'Elit' in 'Franquette', ki jih sadni izbor priporoča za gojenje v krajih s poznimi spomladanskimi slanimi. Želeli smo ugotoviti katero topilo je uspešnejše pri ekstrahiranju fenolnih snovi iz zelenih plodičev. Fenolne snovi so koristne za človekovo zdravje in zato se zanimanje zanje povečuje.

Namen raziskave je bil ugotoviti ali obstajajo razlike med količino fenolov, ki se izloči v metanolu in etanolu in katero topilo da boljši izplen. Poleg tega pa smo ugotavljali tudi ali obstajajo razlike v količini fenolnih snovi med sortama.

Ugotovili smo, da obstajajo razlike med topili. Določene fenolne snovi se bolje topijo v metanolu, druge pa v etanolu. Tiste, ki se bolje topijo v etanolu so: elagna kislina in sinapinska kislina, v metanolu pa se bolje topijo: galna kislina, juglon, (+)-katehin in klorogenska kislina.

Skupno smo večjo količino fenolov pridobili z metanolno ekstrakcijo, vendar je za pripravo orehovca etanol ustrezno topilo, saj se izloči podobna količina fenolov kot pri metanolu. To v največji meri velja pri sorti 'Franquette', pri kateri se je v prvem terminu pokazalo, da se v obeh topilih izloči podobna količina fenolnih snovi.

Na ekstrakcijo fenolnih snovi iz rastlin vpliva kemična narava snovi, metoda ekstrakcije, velikost delcev vzorca, dolžina, kot tudi prisotnost motečih snovi. Vsebnost fenolov se skozi rastno dobo spreminja, povečuje ali zmanjšuje, v skladu s funkcijo, ki jo ima določena fenolna snov. Sorta vpliva na količino izločenih fenolov, saj vsebujejo določene sorte različno količino fenolnih snovi. 'Franquette' je sorta, ki ima večjo vsebnost fenolnih snovi kot sorta 'Elit', saj je skupna količina fenolnih snovi, pridobljenih iz plodičev te sorte, večja kot pri sorti 'Elit'. Največ fenolnih snovi pridobimo iz plodičev sorte 'Franquette' v prvem terminu. Pri tej sorti količina fenolov do drugega termina naglo upade, medtem ko pri sorti 'Elit' več ali manj ostaja konstantna v obeh terminih

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589
- Alamprese C., Pompei C. 2004. Influence of processing variables on some characteristics of nocino liqueur. Food Chemistry, 92: 203–209
- Alkohol. 2002.
www.gimvic.org/projekti/timko/2002/2b/alkohol/home.htm (7.5.2008)
- Alkoholi. 2008.
http://vss.biclj.si/dokument/Vaja_2_ALKOHOLI.pdf (7. 5. 2008)
- Ašič S. 1984. Pomoč iz domače lekarne. Celje, Mohorjeva družba: 158 str.
- Bocco A., Cuvelier M. E., Richard H., Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2123-2129
- Brenčič J., Lazarini F. 1997. Splošna in anorganska kemija za gimnazijo, strokovne in tehniške šole. Ljubljana, DZS: 109-110
- Buttery R. G., Light M. D., Nam Y., Merrill B. G., Roitman J. N. 2000. Volatile components of green walnut husks. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2858-2861
- Colarič M., Veberič R., Solar A., Hudina M., Štampar F. 2005. Phenolic acids, syringaldehyde and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 6390-6396
- Colarič M. 2007. Vsebnost izbranih metabolitov v listih in plodovih hruške (*Pyrus communis* L.) sort 'Williams' in 'Conference' glede na arhitektonsko zgradbo rodne veje. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo: 59 str.
- Črnko J. 1990. Naš sadni izbor: najustreznejše sorte za vaš sadovnjak. Ljubljana, Kmečki glas: 244 str.
- De Santis D., Moresi M. 2007. Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties. Industrial Crops and Products, 26: 151–162

- Galle-Toplak. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 310 str.
- Jakopič J., Colarič M., Veberič R., Hudina M., Solar A., Štampar F. 2006. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur. *Food Chemistry*, 104: 100–105
- Kemija. 2001/02. Kemija za študente 1. letnika univerzitetnega študija agronomije - zapiski predavanj, leto 2001/02. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Kemija za študente agronomije 2008.
http://209.85.135.104/custom?q=cache:k9oJ-gEDWcMJ:web.bf.uni-lj.si/zt/kemija/katedra/slo/studenti/AGRONOMIJA%2520UNI/KEMIJA%2520AGR%2520UNI/3.predavanje.ppt+metanol+polarno+topilo&hl=en&ct=clnk&cd=7&lr=lang_sl&client=pub-8993703457585266 (4.2.2008)
- Keršek E. 2006. Zdravilne rastline v vinu in žganju: kako si lahko sami pripravite zdravilne napitke in zeliščna žganja. Ljubljana, V. B. Z.: 166 str.
- Lafka T.-I., Sinanoglou V., Lazos E. S. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104: 1206-1214
- Lapornik B. 2005. Stabilnost polifenolov med staranjem v polizdelkih iz črnega ribeza. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 135 str.
- Lapornik B., Prošek M., Golc Wondra A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214–222
- Macheix J. J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Boca Raton, CRS Press: 378 str.
- Macrae R., Robinson R. K., Sandler M. V. 1993. *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. London, Academic Press: 4514 str.
- Mahoney N., Molyneux R. J. 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1882-1889
- Mességué M. 1980. Zelišča za zdravje. Ljubljana, Tiskarna ČGP Delo: 342 str.
- Naczk M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95–111
- Navadni oreh. 2008. Wikipedija, prosta enciklopedija.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Koeh-081.jpg> (13.3. 2008)

- Ocepek R. 1995. Oreh: Pridelava in uporaba. Ljubljana, Kmečki glas: 98 str.
- Pinto M. S., Lajolo F. M., Genovese M. I. 2007. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107: 1629-1635
- Pratt S., Matthews K. 2004. Najhrana za najzdravje, štirinajst vrst hrane, ki bodo spremenile vaše življenje. Ljubljana, Debora: 384 str.
- Priyadarsini K. I., Khopde S. M., Kumar S. S., Mohan H. 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2200-2206
- Rastlinski sekundarni metaboliti. 2005/06.
<http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Sekundarni%20metaboliti%202004-05.pdf>
(7. 5.2008)
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 933-956
- Schieber A., Keller P., Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910: 265-273
- Schröter W. 1993. Kemija splošni priročnik. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 519-522
- Solar A., Štampar F. 2004. Zveza med rastjo, rodnostjo in foliarno prehrano pri orehu. V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško 24.-26. marec 2004. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije: 295-302
- Solar A. 2006. Lupinarji – tehnologija pridelave. Gradivo razdeljeno na predavanjih za univerzitetni študij agronomije pri izbirnem predmetu Sadjarstvo. 4. letnik, leto 2006/07. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Solar A., Colarič M., Usenik V., Štampar F. 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science*, 170: 453–461
- Štampar F., Solar A., Hudina M., Veberič R., Colarič M. 2006. Traditional walnut liqueur-cocktail of phenolics. *Food Chemistry*, 95: 627-631
- Terpinc P. 2006. Arheje in antioksidanti. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47 str.

- Tokusoglu Ö., Ünal M. K. 2002. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. *European Food Research Technology*, 215:340–346
- Veberič R., Trobec M., Herbinger K., Hofer M., Grill D., Štampar F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1687–1694
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 154 str.
- Yilmaz Y., Toledo R. T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 255-260
- Yu J., Ahmenda M., Goktepe I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*, 90: 199-206

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Franciju Štamparju za vzpodbude, prof. dr. Metki Hudina in doc. dr. Robertu Veberiču za pomoč in nasvete.

Najlepša hvala Katedri za sadjarstvo za pomoč pri pripravi orehovca, Jerneji Jakopič za opravljene analize na HPLC, ves trud in pripravljenost pomagati pri začetnih težavah nastajanja diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Dominiku Vodniku in in akad. prof. dr. Ivanu Kreftu za hiter pregled diplome, prijaznost in razumevanje.

Hvala Blaški Gantar, da je z mano delila svoje izkušnje.

Hvala vsem domačim in prijateljem, ki so me spodbujali in nečakano pričakovali kdaj bom diplomirala.

Hvala vsem, ki ste karkoli prispevali pri nastajanju te diplomske naloge.