

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Blaška GANTAR

**ANALIZA FENOLNIH SNOVI V OREHOVEM  
LIKERJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Blaška GANTAR

**ANALIZA FENOLNIH SNOVI V OREHOVEM LIKERJU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WALNUT LIQUEUR**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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 knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Gantar Blaška

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.833:634.51:543.645:547.56(043.2)
KG	sadjarstvo/oreh/ <i>Juglans regia</i> /orehov liker/Franquette/Elit/fenolne snovi
KK	AGRIS Q04
AV	GANTAR, Blaška
SA	ŠTAMPAR, Franci (mentor)/VEBERIČ, Robert (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2007
IN	ANALIZA FENOLNIH SNOVI V OREHOVEM LIKERJU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 40, [5] str., 1 pregl., 29 sl., 4 pril., 36 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>V tradicionalno pripravljenem orehovem likerju smo s pomočjo HPLC (tekočinske kromatografije visoke ločljivosti) z PDA detektorjem analizirali 13 različnih fenolnih spojin: juglon, 1,4-naftokinon, kavino kislino, galno kislino, elagno kislino, klorogensko kislino, (+)-katehin, <i>p</i>-kumarno kislino, protokatehulno kislino, sinapinsko kislino, vanilno kislino, siringinsko kislino in aldehid siringinske kisline. Orehov liker smo pripravili v dveh različnih terminih (30. 6. 2005 in 7. 7. 2005) iz zelenih, nezrelih plodov orehov sort 'Elit' in 'Franquette'. Fenolne snovi smo iz plodov oreha ekstrahirali z 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Med vsemi analiziranimi fenolnimi snovmi, je bilo največ galne kisline, medtem ko je bila vsebnost ostalih fenolnih snovi nekajkrat nižja. Pomemben delež skupnih analiziranih fenolov predstavljajo tudi siringinska kislina, elagna kislina in (+)-katehin. Juglon je dosegel najnižjo vrednost med vsemi analiziranimi fenolnimi snovmi. Vsebnost fenolnih snovi je bila višja pri sorti 'Franquette', kot pri sorti 'Elit', razen za juglon in vanilno kislino. Plodovi obrani v prvem terminu so se izkazali za boljši vir fenolnih snovi, zato so bolj primerni za proizvodnjo orehovega likerja. V drugem terminu vzorčenja je bila višja vsebnost elagne kisline in aldehida siringinske kisline pri obeh sortah, juglona pri sorti 'Franquette' in siringinske kisline pri sorti 'Elit', vsebnost vseh ostalih fenolnih snovi pa je bila višja v prvem terminu vzorčenja. V orehovem likerju iz 40 % etanola je bilo največ galne kisline, siringinske kisline, vanilne kisline, (+)-katehina, klorogenske kisline in juglona, vsebnost ostalih fenolnih snovi je bila višja v likerju iz višjih koncentracij etanola. Vsebnost skupnih fenolov je bila najvišja v orehovem likerju pripravljenem iz 40 % etanola. Tradicionalno pripravljen orehov liker je bogat vir fenolnih snovi.</p>

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 663.833:634.51:543.645:547.56(043.2)
- CX fruit growing/walnut/*Juglans regia*/walnut liqueur/Franquette/Elit/phenolic compounds/
- CC AGRIS Q04
- AU GANTAR, Blaška
- AA ŠTAMPAR, Franci (supervisor)/VEBERIČ, Robert (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2007
- TI ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WALNUT LIQUEUR
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIII, 40, [5] p., 1 tab., 29 fig., 4 ann., 36 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The phenolic composition of traditional prepared walnut liqueur was investigated using HPLC (high performance liquid chromatography) with a PDA detector. 13 phenolic compounds were identified: juglone, 1,4-naphthoquinone, caffeic acid, gallic acid, ellagic acid, chlorogenic acid, (+)-catechin, *p*-coumaric acid, protocatechuic acid, sinapic acid, vanillic acid, syringic acid and syringaldehyde. The analysed walnut liqueur was made from green, unripened fruits of walnut cultivars 'Elit' and 'Franquette', on two sampling dates (30. 6. 2005 and 7. 7. 2005). The extractions of phenolic compounds were made with 40 %, 60 % and 96 % ethanol. The content of gallic acid was the highest among investigated phenolics, meanwhile the contents of other phenolics were few times lower. Syringic acid, ellagic acid and (+)-catechin represent an important part among all analysed phenolics. Juglone showed very low values compared to other analysed phenolics. The contents of phenolic compounds were higher in cultivar 'Franquette' than in cultivar 'Elit', except for juglone and vanillic acid. On the second sampling date the contents of ellagic acid and syringaldehyde in both cultivars, the content of juglone in cultivar 'Franquette' and content of syringic acid in cultivar 'Elit', were higher than on first sampling date. The contents of other analysed phenolics were higher on first sampling date. In walnut liqueur made with 40 % ethanol the contents of gallic acid, syringic acid, vanillic acid, (+)-catechin, chlorogenic acid and juglone were higher than in liqueur made with higher percent of ethanol. The concentration of total phenolics was higher in liqueur made with 40 % ethanol, than in extracts with higher concentrations of ethanol. Traditional prepared walnut liqueur is rich source of phenolic compounds.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 VZROK ZA RAZISKAVE	1
1.2 NAMEN RAZISKAVE	1
1.3 DELOVNA HIPTEZA	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 NAVADNI OREH ( <i>Juglans regia</i> L.)	2
2.2 PLOD OREHA	2
2.3 KEMIČNA SESTAVA PLODU OREHA	2
2.4 UPORABA OREHA	3
2.5 OREHOV LIKER	3
2.6 FENOLNE SPOJINE	4
<b>2.6.1 Razdelitev fenolnih spojin</b>	<b>5</b>
2.7 VLOGA FENOLNIH SPOJIN	6
<b>2.7.1 Fenolne spojine kot antioksidanti</b>	<b>6</b>
<b>2.7.2 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin iz oreha in vpliv na zdravje človeka</b>	<b>7</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>9</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	9
3.2 SORTE OREHOV	9
<b>3.2.1 Sorta 'Elit'</b>	<b>9</b>

<b>3.2.2</b>	<b>Sorta 'Franquette'</b>	9
3.3	KLIMATSKE IN TALNE RAZMERE NA RAZISKOVALNEM POLJU ZA LUPINASTO SADJE MARIBOR V LETU 2005	10
3.4	METODA DELA	10
<b>3.4.1</b>	<b>Vzorčenje in priprava vzorcev na kemijske analize</b>	10
<b>3.4.2</b>	<b>Analiza s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)</b>	11
<b>3.4.3</b>	<b>Statistična analiza</b>	12
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	13
4.1	JUGLON	13
4.2	1,4-NAFTOKINON	14
4.3	KAVINA KISLINA	16
4.4	GALNA KISLINA	17
4.5	ELAGNA KISLINA	18
4.6	KLOROGENSKA KISLINA	20
4.7	(+)-KATEHIN	21
4.8	<i>p</i> -KUMARNA KISLINA	23
4.9	PROTOKATEHULNA KISLINA	24
4.10	SINAPINSKA KISLINA	26
4.11	VANILNA KISLINA	27
4.12	SIRINGINSKA KISLINA	29
4.13	ALDEHID SIRINGINSKE KISLINE	30
4.14	SKUPNI ANALIZIRANI FENOLI	31
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	34
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	35
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	37
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi	5
---	---



## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Prerez plodu oreha.	3
Slika 2: Povprečna vsebnost juglona $\times 1000 \pm$ standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri $p < 0,05$ .	13
Slika 3: Povprečna vsebnost juglona $\times 1000 \pm$ standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri $p < 0,05$ .	14
Slika 4: Povprečna vsebnost 1,4-naftokinona $\pm$ standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri $p < 0,05$ .	15
Slika 5: Povprečna vsebnost 1,4- naftokinona $\pm$ standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri $p < 0,05$ .	15
Slika 6: Povprečna vsebnost kavine kisline $\pm$ standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri $p < 0,05$ .	16
Slika 7: Povprečna vsebnost kavine kisline $\pm$ standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri $p < 0,05$ .	17

- Slika 8: Povprečna vsebnost galne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 18
- Slika 9: Povprečna vsebnost galne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 18
- Slika 10: Povprečna vsebnost elagne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 19
- Slika 11: Povprečna vsebnost elagne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 19
- Slika 12: Povprečna vsebnost klorogenske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 20
- Slika 13: Povprečna vsebnost klorogenske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 21
- Slika 14: Povprečna vsebnost (+)-katehin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 22

- Slika 15: Povprečna vsebnost (+)-katehin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 22
- Slika 16: Povprečna vsebnost *p*-kumarne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 23
- Slika 17: Povprečna vsebnost *p*-kumarne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 24
- Slika 18: Povprečna vsebnost protokatehulne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 25
- Slika 19: Povprečna vsebnost protokatehulne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 25
- Slika 20: Povprečna vsebnost sinapinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 26
- Slika 21: Povprečna vsebnost sinapinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 26

- Slika 22: Povprečna vsebnost vanilne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 28
- Slika 23: Povprečna vsebnost vanilne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 28
- Slika 24: Povprečna vsebnost siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 29
- Slika 25: Povprečna vsebnost siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 30
- Slika 26: Povprečna vsebnost aldehida siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 30
- Slika 27: Povprečna vsebnost aldehida siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ . 31
- Slika 28: Vsebnost skupnih analiziranih fenolov (mg/l) pri sorti 'Franquette' v obeh terminih obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. 32
- Slika 29: Vsebnost skupnih analiziranih fenolov (mg/l) pri sorti 'Elit' v obeh terminih obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. 32

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A:** Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' v prvem terminu (30. 6. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.
- PRILOGA B:** Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' v drugem terminu (7. 7. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.
- PRILOGA C:** Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' v prvem terminu (30. 6. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.
- PRILOGA D:** Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' v drugem terminu (7. 7. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
HDL	high density lipoprotein; lipoproteini visoke gostote
LDL	low density lipoprotein; lipoproteini nizke gostote
HPLC	high performance liquid chromatography; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
PEOXI	phenol antioxidant index; antioksidativni indeks fenolov
sod.	sodelavci

## 1 UVOD

### 1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

V Sloveniji navadni oreh (*Juglans regia* L.) predstavlja staro, tradicionalno sadno vrsto, ki jo najdemo skoraj na vsakem dvorišču. Opaziti je, da oreh v zadnjih letih pridobiva na pomenu, širi pa se tudi njegova pridelava in predelava. Predvsem je poznana uporaba plodov oreha v kulinariki, nekoliko manj poznana pa je njegova zdravilna funkcija.

Iz mladih, zelenih orehov pripravljamo zdravilno alkoholno pijačo temno rjave barve in grenkega okusa, ki jo imenujemo orehov liker. Poleg tega, da je orehov liker poznan kot zelo okusna pijača, pa je dobro poznana tudi njegova uporaba v tradicionalni ljudski medicini.

Številne raziskave v zadnjih letih so pokazale visoko vsebnost fenolnih snovi v orehu in orehovem likerju. Kljub temu, da fenolne snovi nimajo hranilne vrednosti, so pomembne za človekovo zdravje. Različne vrste hrane in pijače, pridobljene iz sadja, so bogat vir fenolnih snovi, ki kot naravni antioksidanti zmanjšujejo število prostih radikalov in s tem tveganje za nastanek številnih bolezni srca in ožilja, diabetesa, visokega krvnega tlaka, kapi in še mnogih drugih bolezni.

### 1.2 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je bil preučiti vpliv sorte, termina obiranja oziroma zrelosti plodov in koncentracije etanola na vsebnost fenolnih snovi v tradicionalno pripravljenem orehovem likerju. S pomočjo HPLC analize smo želeli določiti fenolne snovi v orehovem likerju, ki smo ga pripravili iz zelenih plodov oreha sort 'Franquette' in 'Elit' v dveh različnih terminih in ekstrakcijo s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

### 1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Delovna hipoteza temelji na predpostavki, da se pri višji koncentraciji etanola v likerju izloči več fenolnih snovi ter, da se koncentracija fenolnih snovi razlikuje glede na sorto in termin obiranja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NAVADNI OREH (*Juglans regia* L.)

Navadni oreh (*Juglans regia* L.) pomološko uvrščamo med lupinasto sadje, botanično pa spada v družino Juglandaceae, ki ima 7 rodov z več kot 60 vrstami listnatih, endomnih dreves, katerih skupna lastnost so pernato sestavljeni listi (Solar, 2004). V svetu je najbolj razširjen rod *Juglans*, znotraj tega rodu pa sta najbolj razširjena navadni oreh (*Juglans regia* L.) in črni oreh (*Juglans nigra* L.) (Ocepek, 1995). Oreh raste v Evropi, v Aziji, severni Indiji, na Kitajskem, v severni, osrednji in južni Ameriki ter Avstraliji. Za gojenje oreha so najbolj primerna zmerno hladna humidna območja s čim manjšimi temperaturnimi nihanji (Štampar in sod., 2005b). V Sloveniji oreh raste tako rekoč povsod ob morju in v notranjosti do nadmorske višine 1000 metrov. Najbolj razširjen je v severovzhodni Sloveniji (Ocepek, 1995).

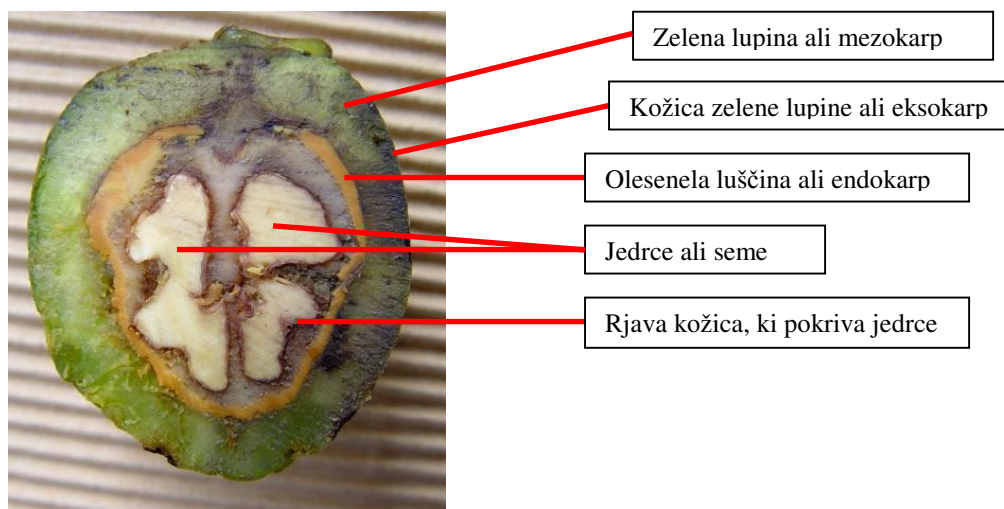
### 2.2 PLOD OREHA

Plod oreha (Slika 1) je luščina z jedrcem in je sestavljen iz zunanje, zelene lupine in trdne, svetlo rjave, olesene luščine ali endokarpa, v kateri se nahaja seme ali jedrce (Ocepek, 1995). Zelena lupina predstavlja zunanji ovoj ali mezokarp oreha, ki se razvije iz zunanjih sten plodnice. Kožica zelene lupine se imenuje eksokarp. Na notranji steni zelene lupine se nahaja mrežica prevodnih tkiv. Debelina zelene lupine je sortna lastnost in znaša pred zorenjem od 3 do 5 milimetrov. Orehovo seme ali jedrce se razvije iz dveh kotiledonov. Sestavljeno je iz dveh polovic, ki sta med seboj ločeni s primarno pregrado. Jedrce predstavlja užitni del orehovega plodu (Solar, 2004). V orehu jedrce štiti tanka, rjava kožica, ki predstavlja le 5 % celotne mase sadeža in je naravno bogata z antioksidativnimi fenolnimi spojinami, ki pomagajo zaščititi jedrce pred oksidacijo oziroma žarkostjo (Colarič in sod., 2005).

### 2.3 KEMIČNA SESTAVA PLODU OREHA

Orehi so visoko energijska hrana z veliko vsebnostjo maščob, sorazmerno visoko vsebnostjo beljakovin, kalija, fosforja in folata ter z veliko vlaknin in nizko vsebnostjo sladkorjev. V primerjavi z drugimi lupinarji, ki vsebujejo predvsem enkrat nenasičene maščobne kisline, so orehi edinstveni, saj so bogati z n-6 in z n-3 večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami. Izbrane vrednosti hranila na 100 gramov jedrc oreha so: energijska vrednost (654 kcal oziroma 2747 kJ), skupne maščobe (65,2 g), beljakovine (15,2 g), vlaknine (6,7 g), fosfor (346 mg), kalij (441 mg) in folat (98 µg). Orehi so tudi bogat vir vitamina E (2,9 g), ki deluje kot antioksidant, in drugih biološko aktivnih snovi, kot so fenolne spojine in steroli (Feldman, 2002).





Slika 1: Prerez plodu oreha (Razpet, 2002)

## 2.4 UPORABA OREHA

Uporaba oreha je zelo raznolika in razširjena. Zeleni orehi, lupine, jedrca, semena, lubje, les in listi se uporabljajo v lesni industriji, krovstvu, livarski in plastični industriji, v tekstilni industriji za barvanje tekstilije ter v farmacevtski in kozmetični industriji (Colarič in sod., 2005). Zelo raznovrstna pa je tudi uporaba orehov v prehrani. Orehi so pomemben vir koristnih prehranskih maščob in potencialno bogat vir fenolnih spojin, ki prispevajo k antioksidativni zmožnosti človeške plazme (Anderson in sod., 2001). Jedrca zrelih plodov največ uporabljamo za pripravo raznih sladice, kot so tradicionalna slovenska potica, biskviti, sadne rezine, sladoledi, pa tudi za pripravo kruha, štrukljev, različnih nadevov in solat (Ocepek, 1995). Mladi, zeleni orehi so zelo cenjeni v tradicionalni ljudski medicini, saj se iz njih izdeluje orehov liker, ki se uporablja kot zdravilna, alkoholna pijača (Štampar in sod., 2006).

## 2.5 OREHOV LIKER

Orehov liker je lahka, alkoholna pijača keltskega izvora (Alamprese in Pompei, 2005). Njegova uporaba v tradicionalni ljudski medicini je zelo znana in cenjena tako v Sloveniji, kot v večini ostalih evropskih držav (Štampar in sod., 2006). V Italiji orehov liker imenujejo nocino, njegova proizvodnja pa je povezana s starodavnimi vražami in legendami. Nezrele, zelene orehe, namenjene za izdelavo likerja, tradicionalno obiramo v noči na 24. junij, ko praznujemo praznik rojstva svetnika Janeza Krstnika. Ta dan sovpada s koncem poletnega sončevega obrata oziroma koncem poletnega solsticija (Alamprese in Pompei, 2005). V preteklosti so verjeli, da je noč poletnega sončnega obrata prinesla dobroto na Zemljo in med človeštvo, zato je bila uporaba določenih rastlin močno pod vplivom tega verovanja (Alamprese in sod., 2005). Alamprese in Pompei (2005) so kasneje

dognali, da so zelišča in orehi nabrani v tem času močno pod vplivom sprememb v sončni elipsi in hkratnih sprememb v rastnem ciklusu rastline.

Za proizvodnjo orehovega likerja obstaja veliko število receptov in metod, še vedno pa prevladuje tradicionalen način proizvodnje. Orehe obiramo nezrele, ko je lupina še zelena, endokarp pa je že razvit, a še ni popolnoma lignificiran oziroma olesenel. Za liker je najbolje, da plodove oberemo v drugi polovici meseca junija, ker bi lahko vsako zavlačevanje z obiranjem imelo negativen vpliv na kvaliteto likerja. Cele plodove operemo, narežemo na četrtine in namakamo v etanolu od 1 do 3 mesece, skupaj z različnimi zelišči in začimbami, kot so nageljeve žbice, cimet, koriander, kavna zrna in limonina lupina, ki ustvarjajo razlike v izraženem okusu. Ko je proces namakanja končan, tekoči del ločimo od trdnega. Po filtriranju dobljeno tekočino razredčimo z dodajanjem sirupa narejenega iz sladkorja in vode, tako da je koncentracija alkohola približno 40 %. Da pa bi dosegli pravo ravnotežje med vsebovanimi aromatičnimi snovmi v likerju, ga pustimo starati za obdobje od 3 mesecev do več let.

Orehov liker je cenjen predvsem zaradi grenkega, visoko razvitega in privlačnega okusa, zaradi zelo posebne arome, temno rjave barve in njegovih lastnosti, kot sta krepilna moč in pomoč pri težavah s prebavili. Ostale lastnosti, ki so povezane z njegovo sposobnostjo povečanja izločanja želodčnih sokov, bi lahko izvirale iz visoke vsebnosti fenolnih snovi, ki so jih našli v orehovem likerju in z njihovo antioksidativno močjo (Alamprese in sod., 2005). Od fenolnih snovi pa je odvisna tudi grenkoba in moč hrane, zato je grenak okus orehovega likerja lahko posledica vsebovanih fenolnih snovi (Jakopič in sod., 2007).

Alamprese in sod. (2005) so raziskovali antioksidativno delovanje orehovega likerja. Izkazalo se je, da je antioksidativna aktivnost neposredno povezana z vsebnostjo skupnih fenolov, skupnih taninov in netaninskih fenolov in se tudi po več letih staranja ni spreminjala. Alamprese in Pompei (2005) poročata, da ima zrelost velik vpliv na vsebnost fenolnih snovi in hkrati antioksidativno aktivnost, ki je bila najvišja v najmanj zreli seriji orehov, medtem ko imata temperatura in dolžina namakanja le majhen vpliv na sestavo likerja.

## 2.5 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine (imenujemo jih tudi fenolne snovi, rastlinski fenoli, polifenoli ali polifenolne spojine) so zelo raznolika skupina sekundarnih metabolitov (Robards in sod., 1999). Mednje prištevamo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več hidroksi (-OH) skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi običajno najdemo spojine z več hidroksi skupinami (Abram in Simčič, 1997).

V rastlinah nastajajo fenolne spojine po dveh glavnih biogenetskih poteh. Glavnina fenolnih spojin nastane po poti šikiminske kisline iz fenilalanina ali njegovega prekursorja šikiminske kisline. Flavonoidi ( $C_6-C_3-C_6$ ) pa nastajajo kot produkt iz poti šikiminske in malonske kisline (Strack, 1997; Abram in Simčič, 1997).

### 2.5.1 Razdelitev fenolnih spojin

Ker v literaturi vlada precejšna zmeda na področju poimenovanja fenolnih spojin, se uporablja predvsem razdelitev po številu C-atomov v molekuli (Preglednica 1), (Goodwin in Mercer, 1983).

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983)

Število C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	$C_6$	Fenoli
7	$C_6C_1$	Fenolne kisline
8	$C_6C_2$	Fenilocetne kisline
9	$C_6C_3$	Hidroksicimetne kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni
10	$C_6C_4$	Naftokinoni
13	$C_6C_1C_6$	Ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	Stilbeni Antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	Flavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	Lignani Neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	Biflavonoidi
n	$(C_6C_3)_n$	Lignini
	$(C_6)_n$	Melanini
	$(C_6C_3C_6)_n$	Kondenzirani tanini

**Fenolne kisline** najdemo skoraj povsod v rastlinah (Abram in Simčič, 1997). Delimo jih v tri skupine: hidroksibenzojske kisline, hidroksicimetne kisline in kumarine. V prvo skupino spadajo hidroksibenzojske kisline, ki so derivati benzojske kisline z osnovno formulo  $C_6-C_1$ . V to skupino spadajo spojine, kot so: *p*-hidroksibenzojska kislina, vanilna kislina, galna kislina, elagna kislina, siringinska kislina in protokatehulna kislina (Macheix in sod., 1990). Hidroksicimetne kisline so druga skupina fenolnih kislin s splošno formulo  $C_6-C_3$ . Glavni predstavniki te skupine so *p*-kumarna kislina in kavina kislina ter njuna metilirana derivata: ferulna kislina in sinapinska kislina ter klorogenska kislina (Macheix in sod.,

1990; Abram in Simčič, 1997). Tretjo skupino fenolnih kislin predstavljajo kumarini s splošno formulo  $C_6-C_3$  (Macheix in sod., 1990).

**Naftokinoni** so fenolne snovi s splošno formulo  $C_6-C_4$  (Robards in sod., 1999). Med naftokinoni največ zanimanja vzbuja juglon zaradi svoje kemične reaktivnosti. Poleg juglona med naftokinone spada tudi 1,4-naftokinon (Štampar in sod., 2006; Jakopič in sod., 2007).

**Flavonoidi** predstavljajo najbolj razširjeno in raznoliko skupino fenolnih spojin (Robards in sod., 1999). Osnovno spojino, flavan oziroma 2-fenilbenzopiran, sestavljajo strukture, ki jih označimo s  $C_6-C_3-C_6$ . Med flavonoide spadajo spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega  $C_3$  obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B in C. Flavonoide ločimo na flavone (luteonin, apigenin), flavonole (kvarcetin, kampferol, miricetin), katehine (katehin, epikatehin), flavanone (hesperatin, naringenin), dihidroflavonole, flavan-3,4-diole, antocianidine (pelargonidin, cianidin, malvidin), izoflavone (genistein, daidzein), neoflavone, kalkone (arbutin), dihidrokalkone in avrone (Abram, 2000; Abram in Simčič, 1997; Vrhovšek, 2001).

## 2.6 VLOGA FENOLNIH SPOJIN

Fenolne spojine imajo mnogo funkcij (Gordon, 2003). V naravi so pomembne za zaščito rastlin pred rastlinojedci, delujejo kot kemične signalne spojine pri cvetenju, oplojevanju in rastlinski simbiozi. Prispevajo tudi k odpornosti rastlin proti mehanskim stresom, ki so posledica prisotnih insektov ali mehanskih poškodb, infekcij z glivami, bakterijami in virusi (Abram in Simčič, 1997). Fenolne snovi pa so zelo pomembne tudi v človeški prehrani, zaradi svojih antioksidativnih, antimikrobnih, antimutagenih in protivnetnih lastnosti ter zato, ker ščitijo pred nastankom rakavih in trombotičnih obolenj (Štampar in sod., 2005a). Prispevajo tudi k okusu, vonju in barvi živil in pijač (Abram in Simčič, 1997). Pomembni so predvsem kot antioksidanti, ki delujejo kot lovilci prostih radikalov, kot kelatorji kovinskih ionov in reducenti (Gordon, 2003).

### 2.6.1 Fenolne spojine kot antioksidanti

Kljub temu, da fenoli nimajo znane prehranske funkcije, so zelo pomembni za človekovo zdravje (Jakopič in sod., 2007).

Prosti radikali so atomi, molekule in ioni z vsaj enim elektronom brez para. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni (Korošec, 2000). Antioksidanti so spojine, ki so v snovi prisotne v majhnih koncentracijah in preprečujejo ali zmanjšujejo oksidacijo snovi. Fiziološka vloga antioksidantov je zaščita celic pred poškodbami, ki so posledice kemičnih reakcij, pri

katerih se sproščajo prosti radikali (Young in Woodside, 2001). Prosti radikali in antioksidanti so v telesu v stalnem ravnotežju, če pa se to ravnotežje podre, se pojavi oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov in z odstranjevanjem ali popravitom oksidativno poškodovanih molekul (Korošec, 2000).

Polifenolne spojine lahko delujejo tudi kot naravni antioksidanti. Antioksidativne učinke imajo predvsem flavonoidi, derivati cimetine kisline in kumarini. Znano je, da imajo na antioksidacijsko sposobnost velik vpliv položaj in razporeditev –OH skupin. Dobri antioksidanti so predvsem flavonoidi, za katere menijo, da preprečujejo peroksidacijo lipidov (Abram in Simčič, 1997).

## **2.6.2 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin iz oreha in vpliv na zdravje človeka**

Mnoge raziskave so potrdile pozitivne učinke antioksidativnega delovanja fenolnih snovi iz oreha in ostalih lupinarjev na zdravje človeka.

Plodovi oreha in njegovi proizvodi, kot je orehov liker, so bogat vir fenolnih spojin in se uporabljajo v ljudski medicini širom po svetu (Prasad, 2003).

Kornsteiner in sod. (2006) so v svoji raziskavi analizirali vsebnost tokoferolov, karotenoidov in skupnih fenolov v desetih različnih vrstah lupinarjev. Poročali so, da lupinarji služijo kot dober vir fenolnih spojin z visokim antioksidativnim potencialom. Najnižjo povprečno vsebnost galne kisline so izmerili v pinijah, in sicer 32 mg/100 g pinij. Najvišjo povprečno vsebnost galne kisline pa so izmerili v jedrcu oreha, in sicer 1625 mg/100 g jedrc. Ugotovili so, da največ skupnih fenolov in skupnih tokoferolov vsebujejo orehi, pistacije in pekani. Navajajo, da antioksidanti iz sadja in zelenjave, kot so tokoferoli in polifenoli, igrajo pomembno vlogo pri zaščiti pred rakavimi obolenji, vnetnimi aktivnostimi in srčno-žilnimi obolenji. Poleg tokoferolov in polifenolov, lupinarji vsebujejo še mnoga druga hranila in spojine, ki imajo potencial za zmanjšanje tveganja za nastanek srčno-žilnih obolenj. Glede na antioksidativni potencial so lupinarji odličen vir tokoferolov in fenolnih snovi.

Kris-Etherton in sod. (1999) so v svoji raziskavi navedli, da imajo lupinarji ugodno maščobno-kislinsko in hranilno sestavo, saj vsebujejo veliko bioaktivnih komponent, ki ugodno vplivajo proti nastanku srčno-žilnih obolenj. Predvsem elagna kislina in flavonoidi imajo ugoden vpliv na zniževanje LDL (low density lipoprotein ali lipoproteini nizke gostote) holesterola.

Tudi Anderson in sod. (2001) so odkrili, da rastlinska hrana, ki vsebuje veliko fenolnih spojin, kljub temu, da vsebuje veliko maščobnih kislin, vpliva na zmanjšano pojavnost

smrtnosti zaradi srčno-žilnih obolenj, deluje proti nastanku rakavih obolenj ter ščitijo LDL holesterol proti oksidativnim spremembami in s tem pred aterosklerozo. Navedli so, da ima uživanje orehov ugoden vpliv na lipidni profil limfne tekočine s tem, da zmanjšuje skupni holesterol in LDL holesterol ter triacilgliceride in povečuje HDL (high density lipoprotein ali lipoproteini visoke gostote) holesterol in apolipoprotein A<sub>1</sub>. Fenolne snovi iz oreha učinkovito zavirajo oksidacijo LDL holesterola.

Gunduc in El (2003) sta določila vsebnost fenolnih snovi v 25 različnih vrstah običajno zaužite hrane v Turčiji. V *in vitro* razmerah so vzgojili oksidiran LDL holesterol, nato pa so izmerili vpliv fenolnih snovi na zaviranje oksidacije LDL holesterola. Turška kava (2389 mg/l) in jedrca oreha (7052 mg/kg) so imeli najvišjo vsebnost skupnih fenolov, hkrati pa so imeli jedrca oreha in rdeče vino najvišjo PEOXI (phenol antioxidant index ali antioksidativni indeks fenolov) vrednost.

Halvorsen in sod. (2002) so preučevali učinke rastlinsko osnovane diete na zaviranje razvoja nekaterih kroničnih bolezni. Poročali so, da ima oreh največjo vsebnosti antioksidantov med analiziranimi plodovi in semeni (>20 mmol/100 g), medtem ko je med vsemi analiziranimi rastlinami največ antioksidantov vseboval šipek (~ 40 mmol/100 g).

Juglon je znan po svojem antimikrobnem učinku, zmanjšuje pa tudi pojavnost tumorjev malega črevesja pri podganah (Sugie in sod., 1998 cit. po Štampar in sod., 2006).

Lee in sod. (2004) so poročali, da (+)-katehin zavira oksidacijo LDL holesterola in ščiti limfne celice pred citotoksičnimi učinki oksidiranega LDL holesterola. Poročali pa so tudi, da *p*-kumarna kislina zavira oksidacijo LDL holesterola.

Feldman (2002) je v svoji raziskavi iskal znanstvene dokaze o, za zdravje koristni, zvezi med orehi in koronarnimi boleznimi. Ugotovili so, da orehi, kot del za srce zdrave diete, znižujejo vsebnost holesterola v krvi pri ljudeh in živalih, kar je predvsem posledica ugodne maščobno-kislinske sestave. Oreh vsebuje tudi veliko zdravju koristnih komponent, kot je nizko razmerje lizin: arginin in visoke vsebnosti vitamina E, arginina, folata, vlaknin, taninov in fenolnih snovi.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 RASTLINSKI MATERIAL**

Kot rastlinski material, ki smo ga uporabili za analizo fenolnih snovi v orehovem likerju, smo uporabili mlade, zelene, nezrele orehe sort 'Elit' in 'Franquette', katerih luščina še ni lignificirala. Rastlinski material smo nabrali v dveh terminih - 30. 6. 2005 (1. termin) in 7. 7. 2005 (2. termin), v kolekcijskem nasadu Biotehniške fakultete, na Raziskovalnem polju za lupinarje v Mariboru.

#### **3.2 SORTE OREHOV**

##### **3.2.1 Sorta 'Elit'**

Sorta 'Elit' je selekcija Biotehniške fakultete Ljubljana, izpostava Maribor, avtorice Tatjane Hlišč. Nastala je iz semena neke francoske sorte. Drevo je bujno, razmeroma razvejano, v mladosti precej pokončno. Primerna je za gojenje v vrtovih in nasadih tudi na nevinogradniških legah.

Masa plodu je približno 10 gramov, je srednje velik in jajčaste oblike. Luščina je nekoliko debelejša, hrapava, svetlo rjave barve in dobro zaprta. Svetlo rumena jedrca, ki so dobrega okusa, se zlahka izluščijo. Dobit jedrc je 46 %. Jedrca imajo 67 % maščobe in 15 % beljakovin (Ocepek, 1995).

Povprečen čas brstenja, izmerjen za obdobje od 1991-2001, je 30. aprila, čas polnega cvetenja ženskih cvetov je 13. maja in čas zrelosti plodov je 23. septembra (Jakopič in sod., 2007).

##### **3.2.2 Sorta 'Franquette'**

Francoska sorta 'Franquette' izvira iz okolice Grenobla in je ena najbolj razširjenih sort oreha na svetu. Drevo je počasne rasti in ne preveč bujno. Odžene in cveti pozno, skoraj sočasno z sorto 'Elit', zato na pozebe ni občutljiva (Ocepek, 1995). Zori v drugi dekadi oktobra. Rodi redno in dobro (Solar, 2004).

Plod je podolgovat, koničast, debel, z maso od 9,5 do 12 gramov. Ima srednje tanko, čvrsto, brazdasto, svetlo rjavo in dobro zaprto luščino. Se zlahka lušči. Jedrca so svetlo rumena in zelo dobre kakovosti. Dobit jedrc je okoli 48 % (Ocepek, 1995).

Povprečen čas brstenja, izmerjen za obdobje od 1991-2001, je 2. maja, čas polnega cvetenja ženskih cvetov je 21. maja in čas zrelosti plodov je 1. oktobra (Jakopič in sod., 2007).

### 3.3 KLIMATSKE IN TALNE RAZMERE NA RAZISKOVALNEM POLJU ZA LUPINASTO SADJE MARIBOR V LETU 2005

Raziskovalno polje za lupinarje se nahaja v Mariboru, ki leži na nadmorski višini 274 m (15° 39' 12" zemljepisne dolžine in 46° 33' 39" zemljepisne širine). V tem nasadu se nahaja bogata kolekcija različnih vrst lupinarjev, poteka pa tudi vzdrževanje in razmnoževanje matičnih rastlin leske in oreha.

V aprilu 2005 je bila v Mariboru povprečna mesečna temperatura 11 °C, povprečna količina padavin pa 100 mm. Vse dni v mesecu je bila temperatura nad 0 °C. V maju je bila povprečna temperatura 16,2 °C, povprečna količina padavin pa 76 mm. Junij je bil za 1,7 °C toplejši od dolgoletnega povprečja. Povprečna mesečna temperatura je bila 19,6 °C, povprečna količina padavin pa 89 mm. V juliju pa je bila nad povprečjem količina padavin, in sicer 201 mm, povprečna mesečna temperatura pa je bila 20,7 °C (Agencija RS..., 2005).

### 3.4 METODA DELA

#### 3.4.1 Vzorčenje in priprava vzorcev na kemijske analize

Zelene plodove oreha sort 'Elit' in 'Franquette' smo, na Raziskovalnem polju za lupinarje v Mariboru, obrali v dveh terminih: 30. junija 2005 (1. termin) in 7. julija 2005 (2. termin), ko luščina še ni lignificirala. Iz nabranih orehov smo na Katedri za sadjarstvo (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani) po tradicionalnem receptu pripravili orehov liker.

Orehe smo narezali na tanke koščke. Za vsak vzorec posebej smo zatehtali 600 gramov sesekljanih orehov, jih dali v steklen kozarec in zalili z 1 litrom etanola različnih koncentracij (96 %, 60 % ali 40 % etanola). Kozarce smo nato neprodušno zaprli in jih postavili za 3 tedne na sonce. Vzorce smo vsak dan premešali, da se je iz orehov izločilo čimveč snovi. Isti postopek smo ponovili tudi za drugo vzorčenje čez en teden.

Po treh tednih smo vzorce precedili skozi hidrofilno gazo, da smo ločili trdni in tekoči del. Orehov liker smo razredčili z metanolom v razmerju 1 : 4, tako da smo 0,3 ml vzorca orehovega likerja skozi poliamidni filter Chromafil AO-45/25 (Machery- Nagel) prefiltrirali v vialo in ga razredčili z 1,2 ml metanola. Iz vsakega kozarca smo naredili 2 vzorca, tako da smo skupaj dobili 48 vzorcev, v katerih so nato na Katedri za sadjarstvo, s



pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), analizirali vsebnost posameznih fenolnih snovi.

### **3.4.2 Analiza s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)**

Analiza, s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivost HPLC, je bila opravljena na Katedri za sadjarstvo (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

Kromatografska analiza temelji na ločevanju posameznih komponent vzorca, ki jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem. Posamezne komponente raziskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (Žorž, 1991). Pri HPLC molekule vzorca na poti skozi kolono prehajajo med mobilno fazo, ki je tekočina majhne viskoznosti in stacionarno fazo, ki je trdna snov. Mobilna faza potuje skozi stacionarno fazo v določeni smeri. Kromatografski proces, ki pri tem nastaja, je rezultat ponavljajoče se sorpcije in desorpcije s stacionarno fazo, ki poteka med potovanjem komponent vzdolž kolone. Do separacije pride zaradi razlik v porazdelitvenih konstantah posameznih komponent vzorca, ki so posledica termodinamskih lastnosti topljencev. Topljenci, ki imajo večjo afiniteto do mobilne faze, pridejo hitreje iz kolone kot topljenci, ki se zadržujejo v stacionarni fazi. Eluirajo se v vrstnem redu po velikosti porazdelitvenih koeficientov glede na stacionarno fazo. Porazdelitev je posledica velikosti porazdelitvenih sil med molekulami topljenca in molekulami obeh faz. Močnejše kot so sile med molekulami topljenca in molekulami v stacionarni fazi, počasneje se topljenec eluira (Šircelj, 2001).

Izbira stacionarne in mobilne faze je pri HPLC bistvenega pomena. Sestavo oziroma polarost mobilne faze lahko med separacijo tudi programirano spreminjamo - ta način imenujemo gradientno izpiranje. Z razvojem črpalk za visoke tlake in konstantne pretoke brez pulziranja, tehnologije kolon in različnih detektorjev, je postala HPLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih (in anorganskih) spojin. Odlikujejo jo hitrost, občutljivost, ločljivost, majhna množina vzorca in večkratna uporaba kolone. Uporabna je v zelo širokem masnem območju (Pečavar, 1998).

Za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo uporabili tekočinski kromatograf Surveyor, proizvajalca Thermo Finnigan (San Jose, ZDA), s kvarterno črpalko, s PDA detektorjem (photodiode array detector), ki zaznava spekter valovnih dolžin v območju od 220-380 nm. Uporabili so analitsko kolono Chromsep HPLC Colum SS (250x4,6 mm, Hypersil 5 ODS) s predkolono Chromsep guard colum SS (10x3 mm) (Chrompack, Nizozemska). HPLC sistem je povezan z kromatografsko delovno postajo ChromQuest™ 4.0. Razmere kromatografije smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Schieber in sod. (2001). Volumen injeciranega vzorca je bil 20 µl, pretok mobilne faze pa 1 ml/min.

Temperatura kolone je bila 25 °C. Ločevanje fenolnih spojin 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 A je njegova vsebnost po 50 minutah padla 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 so kvalitativno določili s primerjavo po retencijskem času, absorpcijskem maksimumu v UV spektru in dodatku standardne raztopine vzorcu pri standardnih raztopinah in spojinah v vzorcih. Koncentracijo posamezne fenolne spojine pa so izračunali na osnovi primerjave površine vrhov na kromatografu standardne raztopine in vzorca.

### **3.4.3 Statistična analiza**

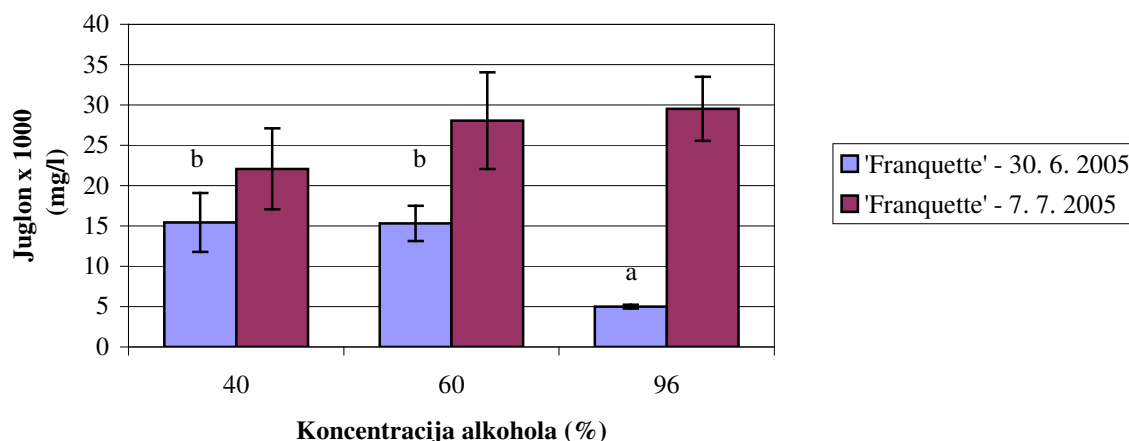
Zbrane podatke smo najprej tabelarično uredili v programu Microsoft Office Excel 2003, nato pa rezultate statistično obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) s pomočjo programa Statgraphics Plus for Windows 4.0. Statistično značilne razlike v vsebnosti fenolnih snovi pri različnih koncentracijah alkohola smo ugotavljali z pomočjo Duncanovega preizkusa mnogoterih primerjav z upoštevanim 5 % tveganjem.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V orehovem likerju, pripravljenem iz zelenih plodov orehov sort 'Elit' in 'Franquette', smo analizirali 13 fenolnih spojin: juglon, 1,4-naftokinon, kavino kislino, galno kislino, elagno kislino, klorogensko kislino, (+)-katehin, *p*-kumarno kislino, protokatehulno kislino, sinapinsko kislino, vanilno kislino, siringinsko kislino in aldehyd siringinske kisline. Rezultate analize vsebnosti fenolov v orehovem likerju, ki smo jih statistično obdelali, predstavljamo v grafični obliki. Vsebnost posamezne fenolne spojine je predstavljena v mg/l orehovega likerja.

### 4.1 JUGLON

Juglon je dobro znana fenolna spojina, ki je v precejšnih količinah prisotna v zelenih delih oreha (Solar in sod., 2006; Štampar in sod., 2006). Vsebnost v jedrcih oreha je nekoliko nižja, vendar je še vedno med tremi prevladujočimi fenolnimi spojinami v jedrcu in rjavi kožici, ki pokriva jedrce (Colarič, 2005).

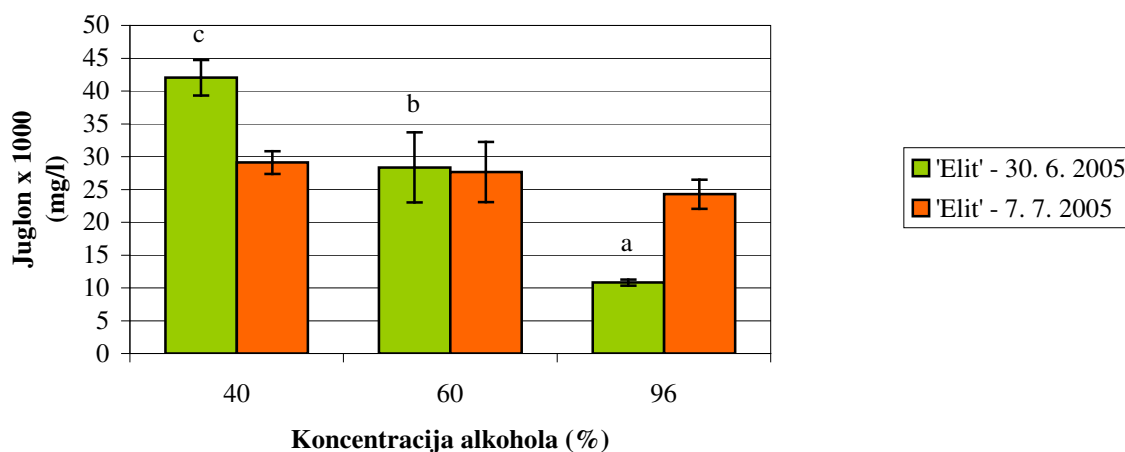


Slika 2: Povprečna vsebnost juglona  $\times 1000 \pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Naša raziskava je pokazala, da je vsebnost juglona pri sorti 'Franquette' višja v 2. terminu (Slika 2), pri sorti 'Elit' pa v 1. terminu (Slika 3). Pri sorti 'Franquette' se je v 1. terminu vsebnost juglona statistično razlikovala le pri ekstrakciji s 96 % etanolom, kjer je bila nižja kot pri ekstrahiranjah s 40 % in 60 % etanolom. Pri sorti 'Elit' pa so se v 1. terminu statistično značilne razlike v vsebnosti juglona pokazale pri ekstrahiranjah z vsemi tremi koncentracijami alkohola, in sicer je najvišja vrednost juglona bila izmerjena pri ekstrakciji s 40 % etanolom ( $0,042 \pm 0,003$  mg/l), nekoliko nižja vrednost pri ekstrakciji s 60 %

( $0,028 \pm 0,005$  mg/l) etanolom in najnižja vrednost pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $0,011 \pm 0,0005$  mg/l). V drugem terminu raziskave niso pokazale statistično značilnih razlik med vsebnostjo juglona pri nobeni sorti. Vsebnost juglona v orehovem likerju je zelo nizka, saj najvišjo vsebnost doseže pri sorti 'Elit' v 1. terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom. Ugotovili smo tudi, da je raven juglona skoraj enaka v likerju narejenem iz sorte 'Elit', kot iz sorte 'Franquette'.

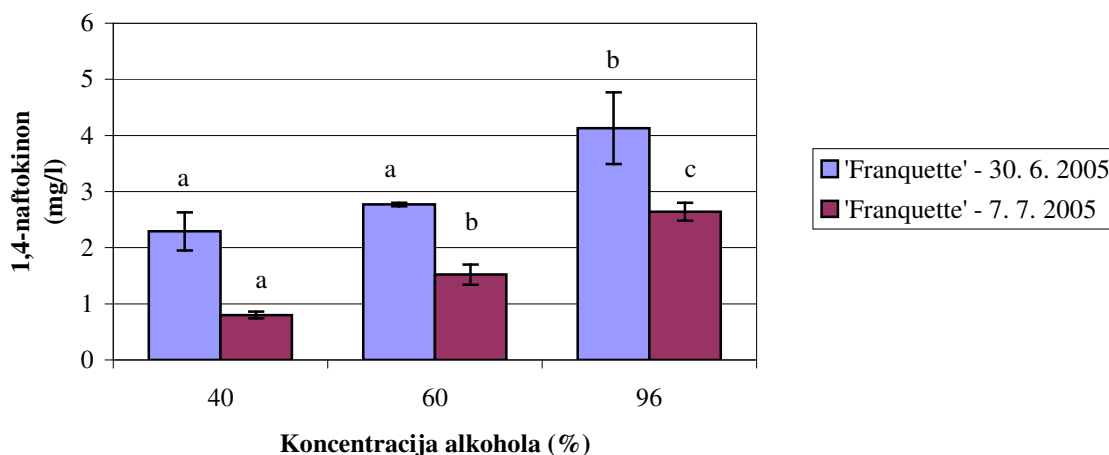
Štampar in sod. (2006) so v svoji raziskavi navedli, da vsebnost juglona v zeleni lupini oreha v juniju, pri sorti 'Elit', lahko doseže več kot 1400 mg/100 g suhe mase, pri sorti 'Franquette' pa lahko preseže tudi 2200 mg/100 g suhe mase. Ugotovili so tudi, da je vsebnost juglona veliko manjša v likerju, kot v zeleni lupini oreha, saj je bila vsebnost juglona v likerju, ki so ga v letu 2003 pripravili iz sorte 'Elit' in z 40 % etanolom, le 0,2 mg/100 ml.



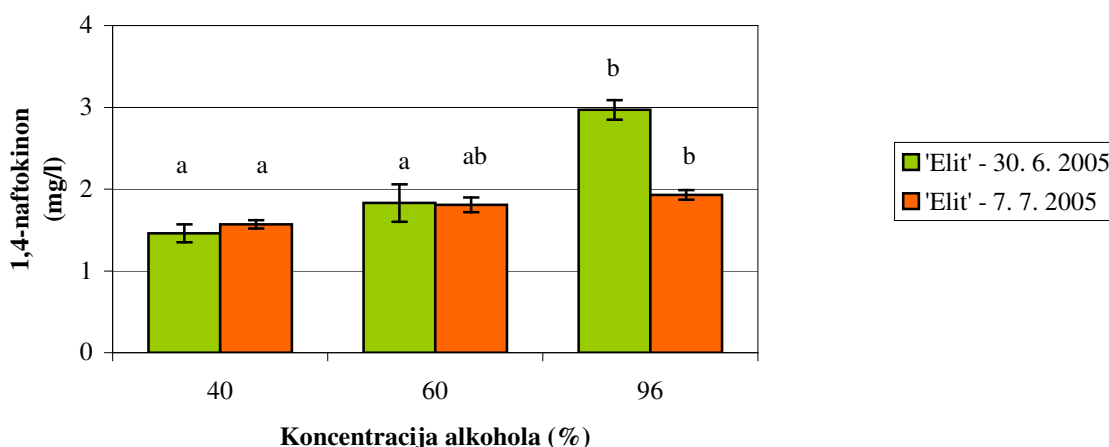
Slika 3: Povprečna vsebnost juglona  $\times 1000 \pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

#### 4.2 1,4-NAFTOKINON

1,4-naftokinon skupaj z juglonom spada v skupino naftokinonov, ki so poleg flavonoidov ena glavnih skupin fenolnih spojin v orehu (Solar in sod., 2006). V nezrelh plodovih navadnega oreha (*Juglans regia* L.) so Binder in sod. (1989) odkrili 8 hlapnih vrst 1,4-naftokinonov. Solar in sod. (2006) navajajo, da naftokinoni predstavljajo največji delež izmed 8 raziskovanih fenolnih snovi v enoletnih poganjkih oreha, vendar je bil delež 1,4-naftokinona kljub temu majhen. V raziskavi fenolnih spojin v zeleni lupini oreha, ki so jo izvedli Štampar in sod. (2006), 1,4-naftokinon ni bil zaznan, njegovo prisotnost pa so v isti raziskavi potrdili v orehovem likerju, ki so ga po tradicionalnem receptu pripravili iz zelenih, nezrelh orehov sorte 'Elit'.



Slika 4: Povprečna vsebnost 1,4-naftokinona  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



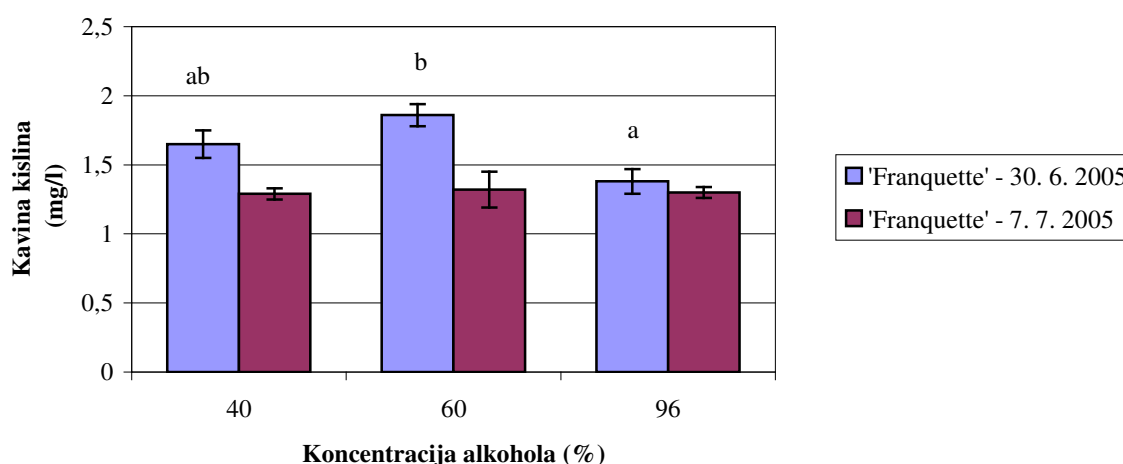
Slika 5: Povprečna vsebnost 1,4- naftokinona  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Vsebnost 1,4-naftokinona v naši raziskavi je tako pri sorti 'Franquette' (Slika 4), kot pri sorti 'Elit' (Slika 5), dosegla najvišje vrednosti v prvem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom. Najvišjo vsebnost smo določili pri sorti 'Franquette', kjer je vrednost dosegla  $4,13 \pm 0,46$  mg/l likerja in se je statistično značilno razlikovala od vrednosti pri ekstrakciji s 40 % in 60 % etanolom. Tudi pri sorti 'Elit' smo najvišjo vrednost izmerili pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $1,93 \pm 0,06$  mg/l), ki se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti pri ekstrakciji s 40 % in 60 % etanolom. Vsebnost 1,4-naftokinona je v drugem terminu manjša kot v prvem pri obeh sortah in pri vseh koncentracijah etanola. Najnižjo vsebnost 1,4-naftokinona smo določili v drugem terminu v likerju iz sorte 'Franquette' in 40 %

etanola in sicer  $0,8 \pm 0,06$  mg/l likerja. Vrednosti 1,4-naftokinona pri sorti 'Franquette' so se v drugem terminu statistično značilno razlikovale pri ekstrahiranjah z vsemi koncentracijami etanola, in sicer je bila najnižja vrednost izmerjena pri ekstrakciji s 40 % etanolom ( $0,8 \pm 0,06$  mg/l) najvišja pa pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $2,64 \pm 0,16$  mg/l). Pri sorti 'Elit' so se v drugem terminu statistično značilne razlike pokazale le za vrednosti pri ekstrakciji s 40 % ( $1,57 \pm 0,05$  mg/l) in 96 % etanolom ( $1,93 \pm 0,06$  mg/l).

#### 4.3 KAVINA KISLINA

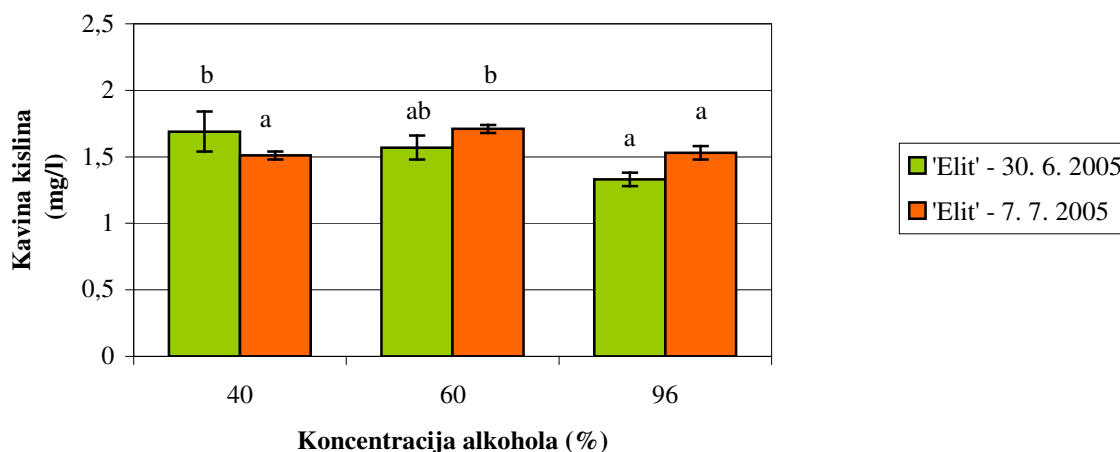
Kavina kislina spada med hidroksicimetne kisline. Njeno vsebnost v jedru in rjavi kožici, ki pokriva jedro oreha, so raziskovali Colarič in sod. (2005) in ugotovili, da je vsebnost kavine kisline v jedru  $0,24$  mg/100 g jedrc in v rjavi kožici  $4,86$  mg/100 g, kar je zelo blizu vsebnosti, ki so jo Štampar in sod. (2006) izmerili v zelenih lupinah oreha in je znašala od 1 do  $1,87$  mg/100 g suhe mase.



Slika 6: Povprečna vsebnost kavine kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Vsebnost kavine kisline v orehovem likerju se med različnimi termini in ekstrahiranjami z različnimi koncentracijami etanola ni bistveno razlikovala. Najvišja vsebnost kavine kisline je bila pri sorti 'Franquette' (Slika 6) v prvem terminu in 60 % koncentraciji etanola ( $1,86 \pm 0,08$  mg/l) in se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $1,38 \pm 0,09$  mg/l). V drugem terminu pri sorti 'Franquette' ni bilo statistično značilnih razlik med vsebnostmi kavine kisline pri posamezni koncentraciji etanola, smo pa v tem terminu izmerili najmanjše vsebnosti kavine kisline ( $\sim 1,30$  mg/l). Pri sorti 'Elit' (Slika 7) so bile vsebnosti nekoliko nižje, od sorte 'Franquette', v prvem terminu in nekoliko višje v drugem terminu. V prvem terminu so se statistično značilne razlike pokazale med ekstrahiranjama s 40 % ( $1,69 \pm 0,15$  mg/l) in 96 % etanolom ( $1,33 \pm$

0,05 mg/l). V drugem terminu se je statistično značilna razlika v vsebnosti kavine kisline pokazala le pri ekstrakciji s 60 % etanolom ( $1,71 \pm 0,03$  mg/l), kjer je bila vsebnost višja kot pri ekstrakciji s 40 % ( $1,51 \pm 0,03$  mg/l) in 96 % etanolom ( $1,53 \pm 0,05$  mg/l).

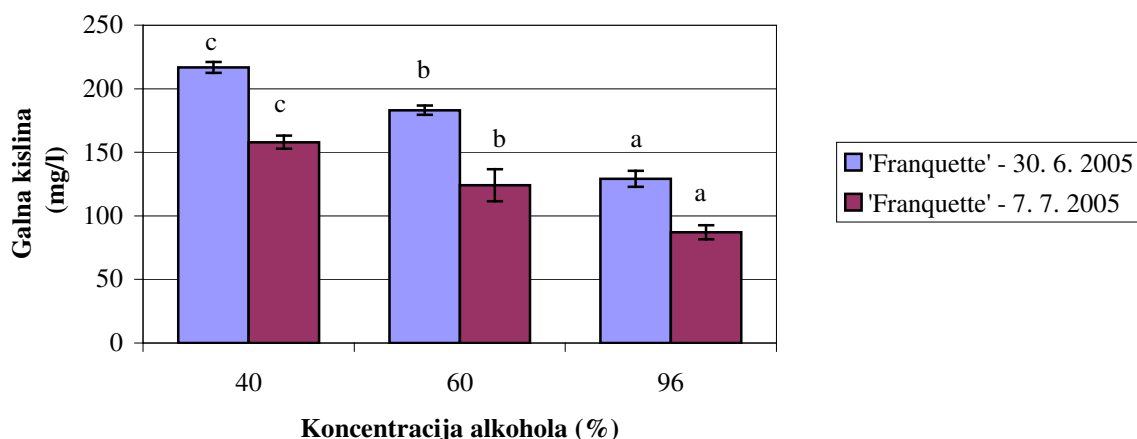


Slika 7: Povprečna vsebnost kavine kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

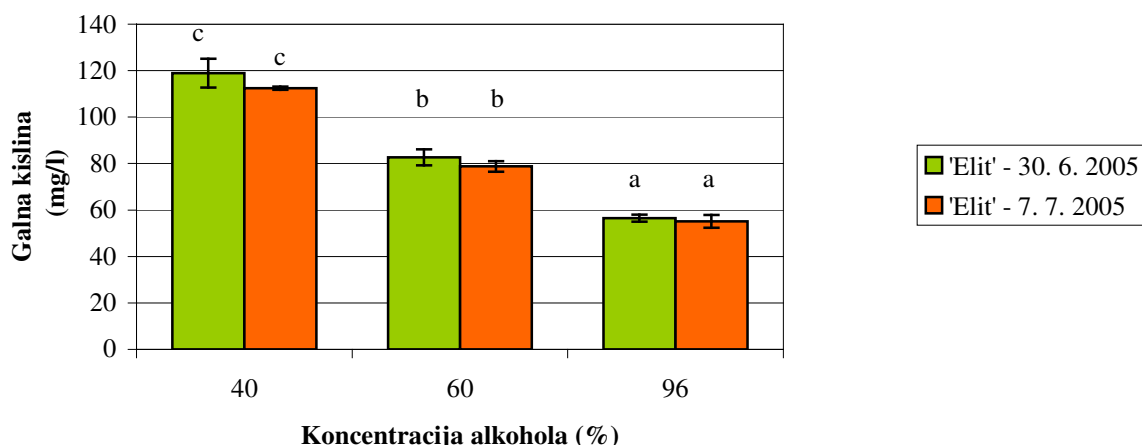
#### 4.4 GALNA KISLINA

Glavna fenolna spojina, analizirana v orehovem likerju, je bila galna kislina, ki spada med hidroksibenzojske kisline. Najvišjo vsebnost smo izmerili pri sorti 'Franquette' (Slika 8) v prvem terminu pri uporabi 40 % etanola, in sicer  $216,77 \pm 4,34$  mg/l, in je lahko tudi več kot 10x večja od vsebnosti ostalih fenolnih spojin v orehovem likerju. Nekoliko nižjo vsebnost smo izmerili v drugem terminu pri isti sorti, najnižjo pa pri sorti 'Elit' (Slika 9) v obeh terminih pri ekstrakciji s 96 % etanolom - v prvem terminu je bila vsebnost  $56,47 \pm 1,49$  mg/l, v drugem terminu pa  $55,16 \pm 2,75$  mg/l. Pri obeh sortah in v obeh terminih so bile razlike med vsebnostmi galne kisline, pri ekstrakcijah z različnimi koncentracijami alkohola, statistično značilne, in sicer najvišje vsebnosti so bile pri obeh sortah in v obeh terminih izmerjene pri ekstrakciji s 40 % etanolom, nekoliko nižje pri ekstrakciji s 60 % etanolom in najnižje pri ekstrakciji s 96 % etanolom.

Podobne rezultate so v svoji raziskavo dobili tudi Štampar in sod. (2006), ki so poročali, da je glavna fenolna spojina v orehovem likerju iz sorte 'Elit' galna kislina, le da je vsebnost le-te bila v njihovi raziskavi nižja (manj kot 7 mg/100 ml), kot so jo pokazali naši rezultati. Pri raziskavi vsebnosti galne kisline v zeleni lupini oreha so ugotovili višjo vsebnost v juniju ( $28,3 \pm 4,65$  mg/100 g suhe mase) kot v juliju ( $13,8 \pm 1,54$  mg/100 g suhe mase).



Slika 8: Povprečna vsebnost galne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



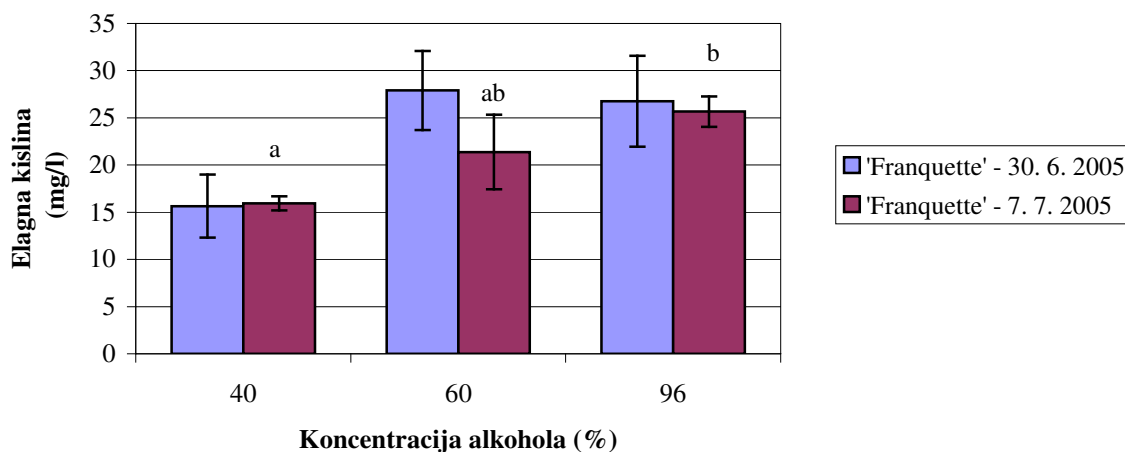
Slika 9: Povprečna vsebnost galne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

#### 4.5 ELAGNA KISLINA

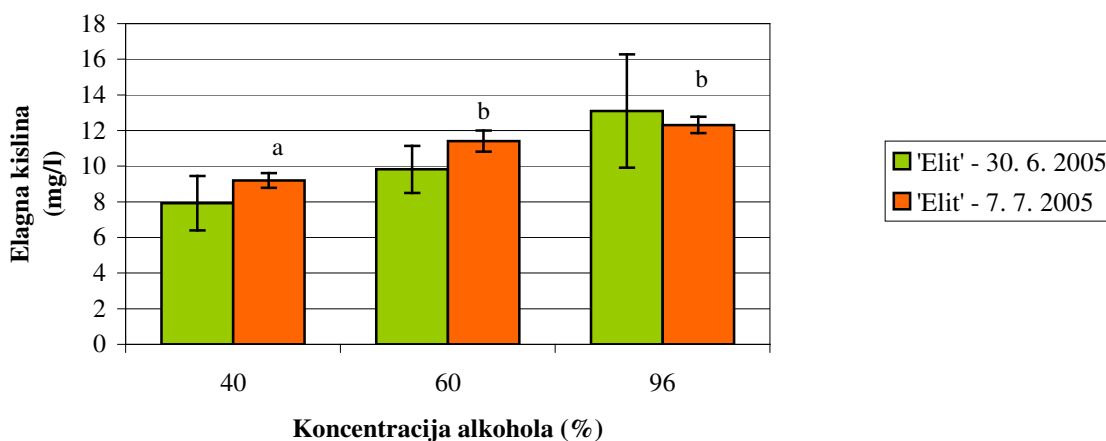
Colarič in sod. (2005) so elagno kislino, ki spada med hidroksibenzojske kisline, analizirali v jedrcu oreha in kožici, ki pokriva jedrce, in ugotovili, da je poleg siringinske kisline in juglona ena od glavnih fenolnih spojin v orehu. Njeno vsebnost v enoletnih poganjkih so raziskali Solar in sod. (2006) in ugotovili, da vsebnosti elagne kisline izmerjene v juniju in juliju, rahlo presegajo vsebnosti v maju, najnižjo vsebnost pa dosežejo v avgustu. Štampar in sod. (2006) poročajo, da je bilo v zelenih lupinah oreha največ elagne kisline izmerjene konec maja, ko je bila vsebnost  $98,3 \pm 5,56$  mg/100 g suhe mase, nato pa je vsebnost



padala vse do konca julija, ko je bila vsebnost  $3,90 \pm 0,84$  mg/100 g suhe mase. V orehovem likerju iz sorte 'Elit' so elagno kislino določili kot eno glavnih fenolnih spojin, njene vsebnosti pa so bile podobne, kot smo jih dobili v naših raziskavah.



Slika 10: Povprečna vsebnost elagne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



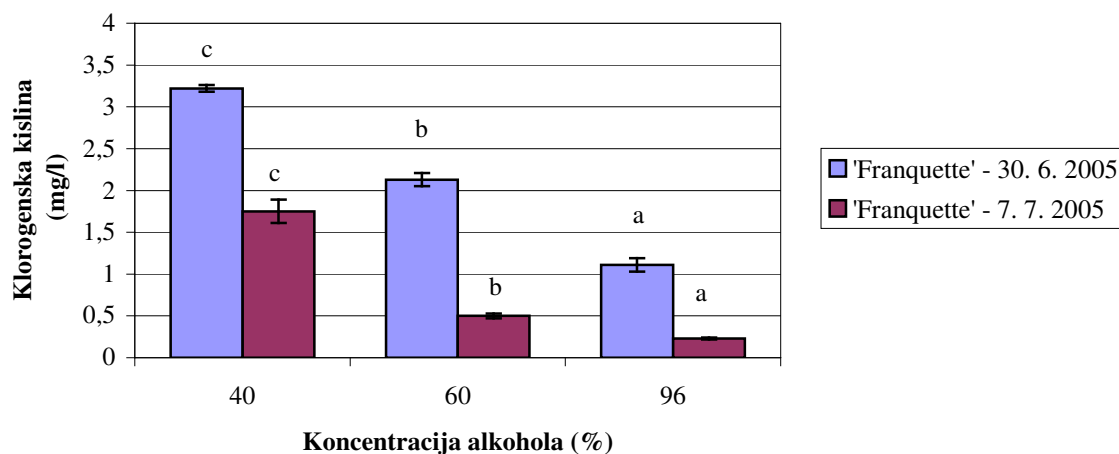
Slika 11: Povprečna vsebnost elagne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Tudi naša raziskava je pokazala, da je elagna kislina ena od glavnih fenolnih spojin v orehovem likerju, čeprav je njena vsebnost veliko nižja od galne kisline. Najvišje vsebnosti elagne kisline smo izmerili v obeh terminih pri sorti 'Franquette' (Slika 10), najnižje pa v obeh terminih pri sorti 'Elit' (Slika 11). Najvišja vsebnost elagne kisline ( $27,9 \pm 4,19$  mg/l)

je bila pri sorti 'Franquette' v prvem terminu pri ekstrakciji s 60 % etanolom. Najnižjo vrednost smo dobili pri sorti 'Elit' v prvem terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom ( $7,92 \pm 1,53$  mg/l). V prvem terminu se pri nobeni sorti niso pokazale statistično značilne razlike. Le-te pa so se pokazale v drugem terminu. Pri sorti 'Franquette' sta se vsebnosti elagne kisline pri likerju iz 40 % etanola ( $15,95 \pm 0,75$  mg/l) in likerju iz 96 % etanola ( $25,66 \pm 1,61$  mg/l) statistično značilno razlikovali. Pri sorti 'Elit' je bila v drugem terminu vsebnost elagne kisline v likerju iz 40 % etanola najnižja ( $9,2 \pm 0,41$  mg/l) in se je statistično značilno razlikovala od obeh drugih vzorcev.

#### 4.6 KLOOROGENSKA KISLINA

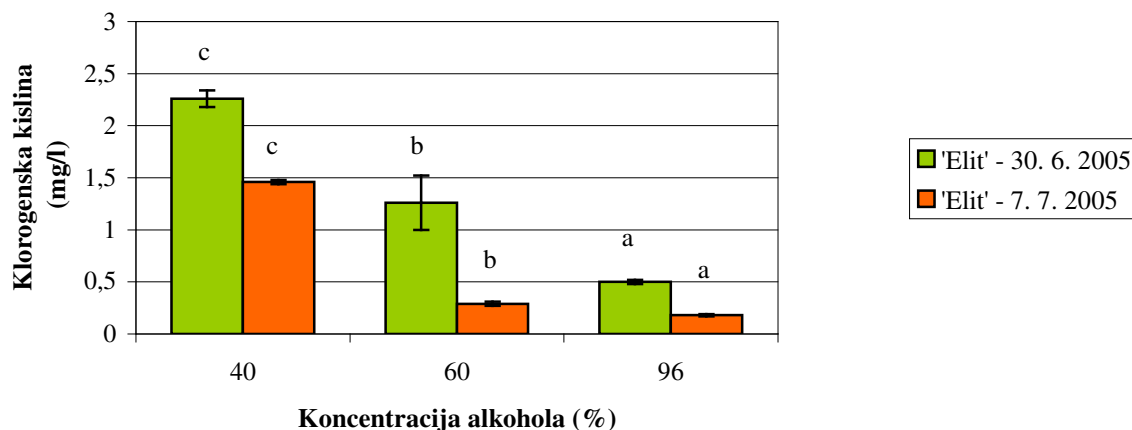
Pri klorogenski kislini, ki jo uvrščamo med hidroksicimetne kisline, smo izmerili eno najmanjših vsebnosti v orehovem likerju.



Slika 12: Povprečna vsebnost klorogenske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Pri obeh sortah in v obeh terminih so bile razlike med vsebnostmi klorogenske kisline pri ekstrakcijah z različnimi koncentracijami alkohola statistično značilne. Najvišjo vrednost smo tako pri sorti 'Franquette' (Slika 12) kot pri sorti 'Elit' (Slika 13) izmerili v prvem terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom ( $3,22 \pm 0,04$  mg/l in  $2,26 \pm 0,08$  mg/l). Najnižjo vsebnost pa je pri obeh sortah bila izmerjena v drugem terminu pri ekstrakciji s 96 % alkoholom, in sicer  $0,23 \pm 0,01$  mg/l pri sorti 'Franquette' in  $0,18 \pm 0,01$  mg/l pri sorti 'Elit'. Pri obeh sortah smo ugotovili, da je vsebnost klorogenske kisline v prvem terminu veliko večja kot v drugem terminu in veliko višja pri ekstrakciji s 40 % etanolom kot z višjimi koncentracijami etanola.

Že v predhodnih raziskavah je bilo dokazano, da je vsebnost klorogenske kisline tako v enoletnih poganjkih oreha, kot tudi v zeleni lupini oreha najvišja konec maja in najnižja v avgustu (Solar in sod., 2006; Štampar in sod., 2006) iz česar lahko sklepamo, da vsebnost klorogenske kisline skozi rastno sezono pada. Štampar in sod. (2006) so v orehovem likerju iz sorte 'Elit' analizirali vsebnost klorogenske kisline, ki pa je bila občutno višja (0,90 mg/100 ml) kot smo jo izmerili v naši raziskavi.



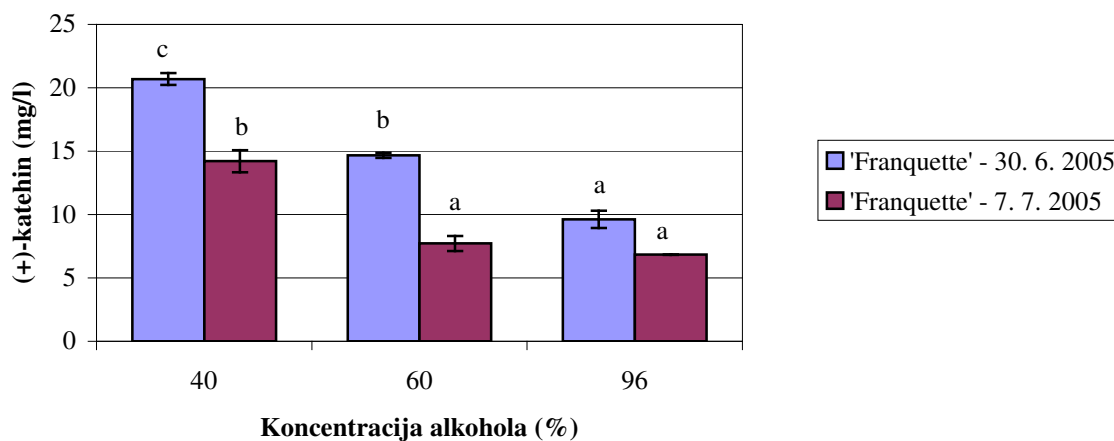
Slika 13: Povprečna vsebnost klorogenske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

#### 4.7 (+)-KATEHIN

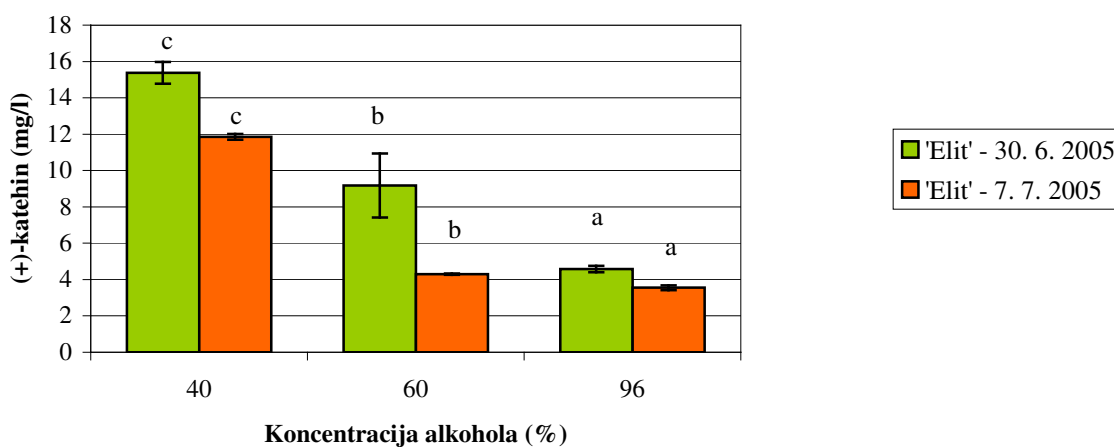
Flavonoidi se, tako kot vse druge fenolne spojine, nahajajo samo v živilih rastlinskega izvora (Macheix in sod., 1990). Največ jih najdemo v sadju, raznih pijačah (čaji, vino, sadni sokovi) in čokoladi, medtem ko je njihova vsebnost v zelenjavi razmeroma nizka (Vrhovšek, 2001).

V naši raziskavi smo v orehovem likerju iz skupine flavonoidov analizirali le (+)-katehin, ki spada v skupino katehinov. Tako pri sorti 'Franquette' (Slika 14), kot pri sorti 'Elit' (Slika 15), so bile v obeh terminih razlike med vsebnostmi (+)-katehina pri ekstrakcijah z različnimi koncentracijami etanola statistično značilne, razen v drugem terminu pri sorti 'Elit', kjer se je le vsebnost pri ekstrakciji s 40 % etanolom statistično značilno razlikovala od vsebnosti pri ekstrakcijah z ostalima dvema koncentracijama etanola. Pri obeh sortah smo najvišje vsebnosti izmerili pri ekstrakciji s 40 % etanolom, nekoliko nižje pri 60 % etanolu in najnižje pri ekstrakciji s 96 % etanolom. Najvišjo vsebnost (+)-katehina smo izmerili v prvem terminu pri sorti 'Franquette' in ekstrakciji s 40 % etanolom ( $20,69 \pm 0,47$  mg/l), najnižjo pa pri sorti 'Elit' v drugem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $3,55 \pm 0,13$  mg/l). Raziskava nam je pokazala, da je vsebnost (+)-katehina pri sorti 'Franquette' v

obeh terminih višja, kot vsebnost pri sorti 'Elit', pri obeh sortah pa je bila vsebnost višja v junijskem vzorčenju kot v julijskem.



Slika 14: Povprečna vsebnost (+)-katehina  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



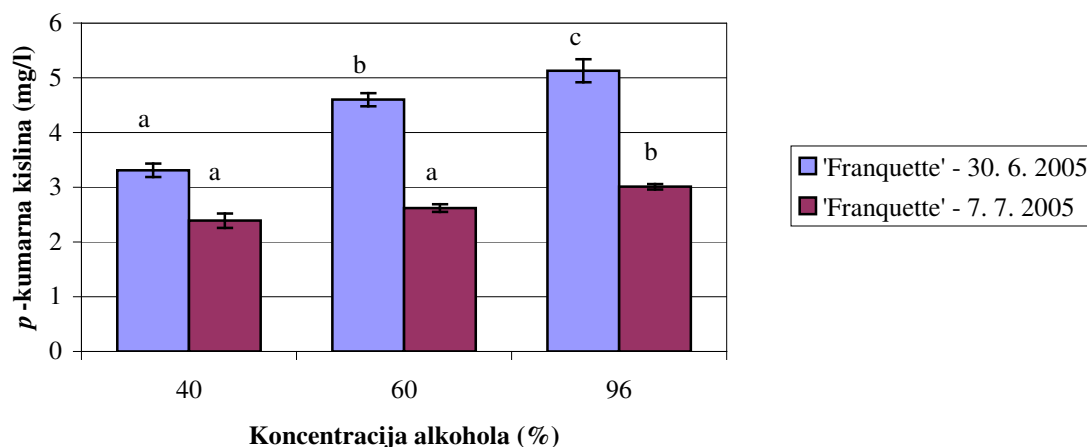
Slika 15: Povprečna vsebnost (+)-katehina  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Nasprotno kot v naši raziskavi je vsebnost (+)-katehina, v enoletnih poganjkih oreha, naraščala od maja, ko je vsebnost bila najnižja, pa vse do avgusta (Solar in sod., 2006). V analizi fenolnih spojin v zeleni lupini, ki so jo opravili v šestih kultivarjih oreha, je bila vsebnost najvišja konec maja, nato je zelo padla in najnižjo vsebnost dosegla v juniju (pri sorti 'Franquette' je koncentracija padla iz 59 na 2 mg/100 g suhe mase), v juliju pa je zopet občutno narasla. Vsebnost (+)-katehina ni bila odvisna od sorte (Solar in sod., 2005).

Analiza orehovega likerja iz sorte 'Elit', ki so jo opravili Štampar in sod. (2006), je pokazala visoke vsebnosti epikatehina, medtem ko je vsebnost (+)-katehina bila veliko nižja (0,2 mg/100 ml) od vrednosti, ki smo jih dobili v naši raziskavi.

#### 4.8 *p*-KUMARNA KISLINA

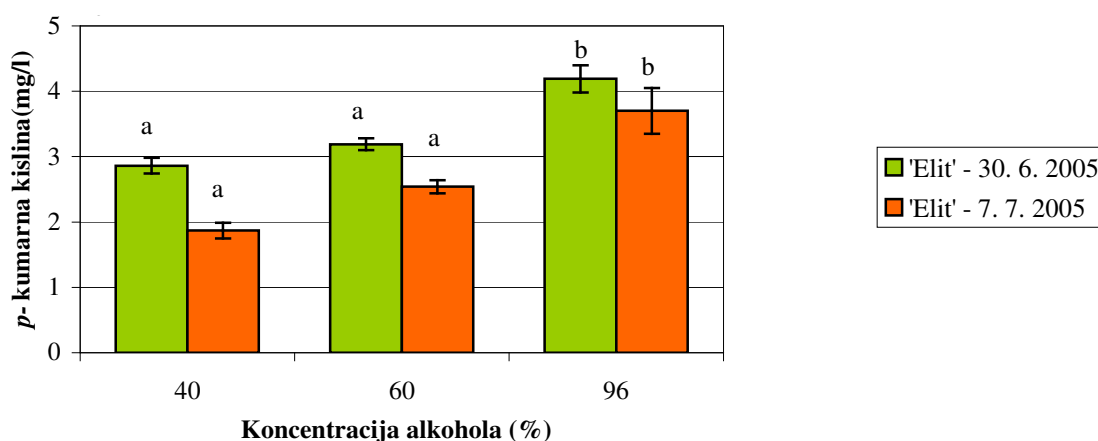
*p*-kumarna kislina, ki spada med hidroksicimetne kisline, je prisotna v veliko vrst sadja. Kot prevladujočo fenolno spojino jo lahko obravnavamo pri nekaterih citrusih in v nekaterih sortah malin in ananasa, veliko pa so jo našli tudi v jagodah in določenih sortah ribeza (Macheix in sod., 1990). O vsebnosti *p*-kumarne kisline pri orehu ni veliko podatkov, saj so njene vrednosti zelo majhne. Colarič in sod. (2005) so *p*-kumarno kislino v majhnih količinah našli tako v jedrcu oreha kot tudi v rjavi kožici, ki pokriva jedrce.



Slika 16: Povprečna vsebnost *p*-kumarne kisline ± standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

V orehovem likerju iz sorte 'Franquette' (Slika 16) smo najvišjo vsebnost *p*-kumarne kisline izmerili v prvem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom, in sicer  $5,13 \pm 0,21$  mg/l. Tudi liker iz sorte 'Elit' (Slika 17) je največ *p*-kumarne kisline vseboval v prvem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom, in sicer  $4,19 \pm 0,21$  mg/l. Pri sorti 'Franquette' so se v prvem terminu vsebnosti *p*-kumarne kisline statistično značilno razlikovale, in sicer smo najnižjo vrednost izmerili v likerju iz 40 % etanola ( $3,31 \pm 0,12$  mg/l), nekoliko višjo v likerju iz 60 % etanola ( $4,6 \pm 0,12$  mg/l) in najvišjo vsebnost v likerju iz 96 % etanola ( $5,13 \pm 0,21$  mg/l). V drugem terminu je bila statistično značilna razlika le pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $3,01 \pm 0,05$  mg/l), kjer je bila vsebnost višja od vsebnosti pri ostalih dveh koncentracijah etanola. Najnižjo vsebnost smo izmerili v drugem terminu pri sorti 'Elit' in ekstrakciji s 40 % etanolom, in sicer  $1,87 \pm 0,12$  mg/l. Pri sorti 'Elit' sta v obeh terminih bili vsebnosti *p*-kumarne kisline višji v likerju iz 96 % etanola in sta se statistično značilno

razlikovali od vrednosti v likerjih iz 40 % in 60 % etanola. Pri obeh sortah ima koncentracija etanola statistično značilen vpliv na vsebnost *p*-kumarne kisline v orehovem likerju, saj smo opazili, da se je pri višji koncentraciji etanola ekstrahiralo več *p*-kumarne kisline.



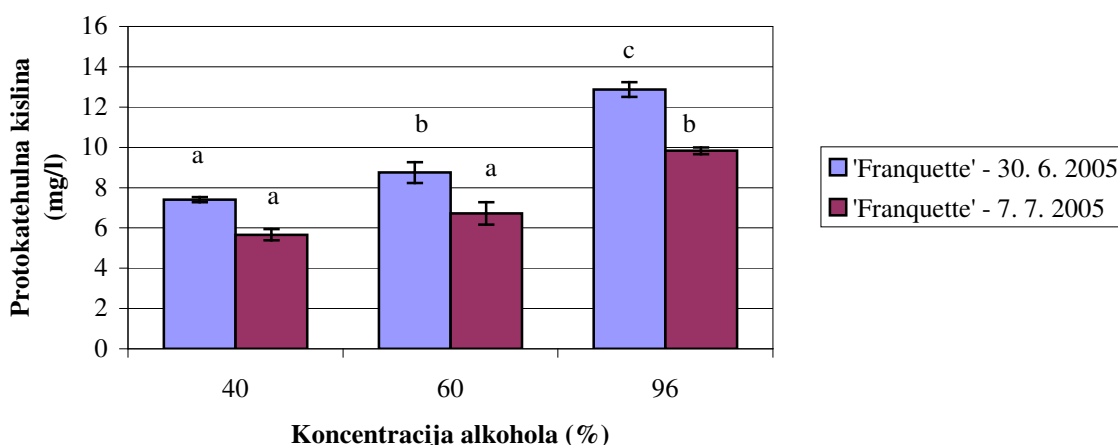
Slika 17: Povprečna vsebnost *p*-kumarne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

#### 4.9 PROTOKATEHULNA KISLINA

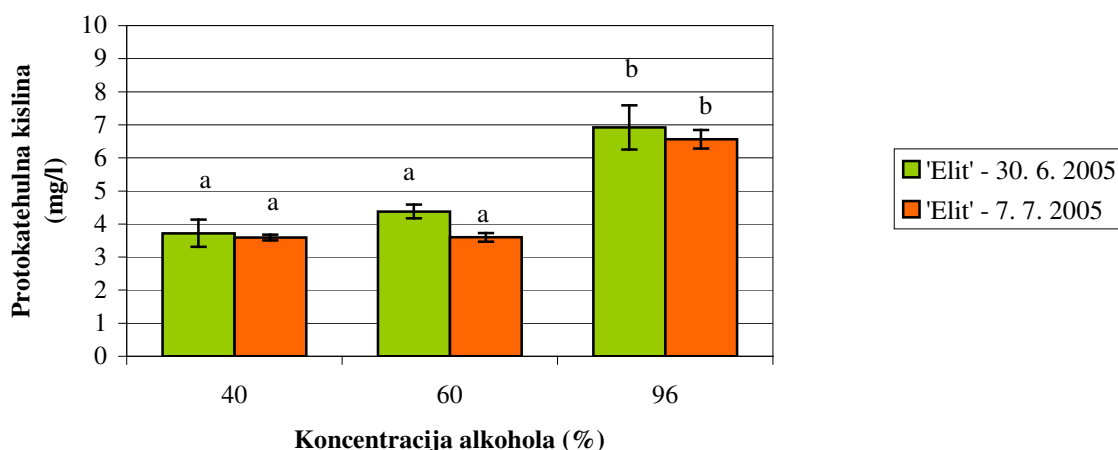
Protokatehulno kislino, ki spada med hidroksibenzojske kisline, v orehovem likerju najdemo v zelo majhnih količinah. Prasad (2003) je poročal, da se protokatehulna kislina in še nekatere fenolne spojine v jedrcu oreha nahajajo v zelo majhnih količinah, in sicer od 2 do 20  $\mu\text{g/g}$ . Štampar in sod. (2006), ki so raziskovali vsebnost fenolnih snovi v zeleni lupini oreha, so poročali, da je bila njena vsebnost najvišja v maju ( $23,0 \pm 4,78$  mg/100 g suhe mase) in je nato do avgusta padla na  $2,92 \pm 0,93$  mg/100 g suhe mase. Poleg tega so protokatehulno kislino našli tudi v orehovem likerju iz sorte 'Elit', njena vsebnost ( $0,10$  mg/100 ml) pa je bila primerljiva z vsebnostjo, ki smo jo izmerili v naši raziskavi.

Pri protokatehulni kislini smo tako pri sorti 'Franquette' (Slika 18), kot pri sorti 'Elit' (Slika 19), opazili vpliv termina obiranja in koncentracije etanola na vsebnost te fenolne spojine v likerju. Vsebnost protokatehulne kisline je večja v likerju iz sorte 'Franquette', kot iz sorte 'Elit'. Najvišjo vrednost,  $12,87 \pm 0,36$  mg/l, smo dobili pri sorti 'Franquette' v prvem terminu in ekstrakciji s 96 % etanolom. Najnižje vsebnosti, približno 3,60 mg/l, pa smo dobili pri sorti 'Elit' v drugem terminu pri ekstrakcijah s 40 % in s 60 % etanolom. V prvem terminu pri sorti 'Franquette' je imela koncentracija etanola statistično značilen vpliv na vsebnost protokatehulne kisline, in sicer je bila vsebnost najnižja v likerju iz 40 % etanola ( $7,4 \pm 0,13$  mg/l), višja je bila v likerju iz 60 % etanola ( $8,75 \pm 0,52$  mg/l) in najvišja v

likerju iz 96 % etanola ( $12,87 \pm 0,36$  mg/l). V drugem terminu pa se je statistično značilna razlika pokazala le pri ekstrakciji s 96 % etanolom ( $9,83 \pm 0,17$  mg/l), kjer je bila vsebnost višja, kot pri ostalih dveh koncentracijah etanola. Pri sorti 'Elit' so se v obeh terminih statistično značilne razlike pokazale le pri ekstrakciji s 96 % etanolom, in sicer je bila vsebnost v prvem terminu  $6,92 \pm 0,67$  mg/l, v drugem terminu pa  $6,56 \pm 0,28$  mg/l. Pri obeh sortah in v obeh terminih vzorčenja smo opazili, da je vsebnost protokatehulne kisline bila višja pri višjih koncentracijah etanola.



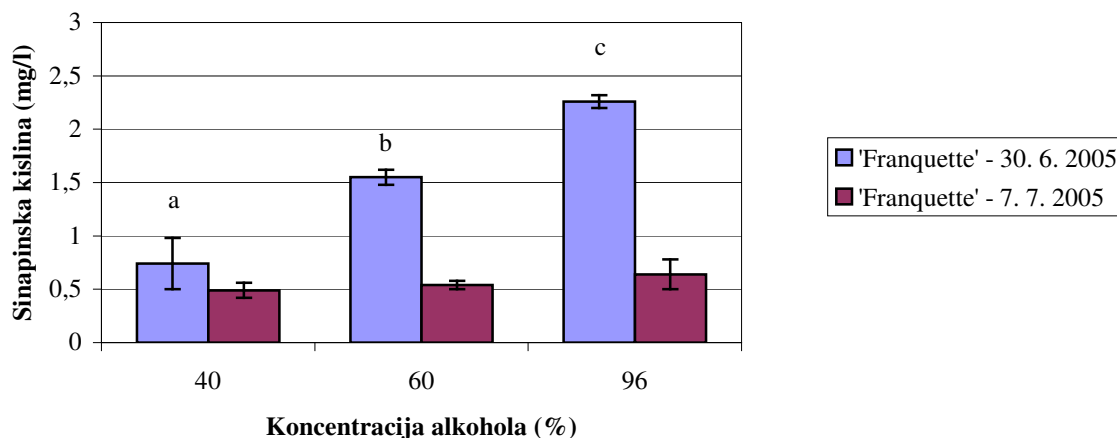
Slika 18: Povprečna vsebnost protokatehulne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



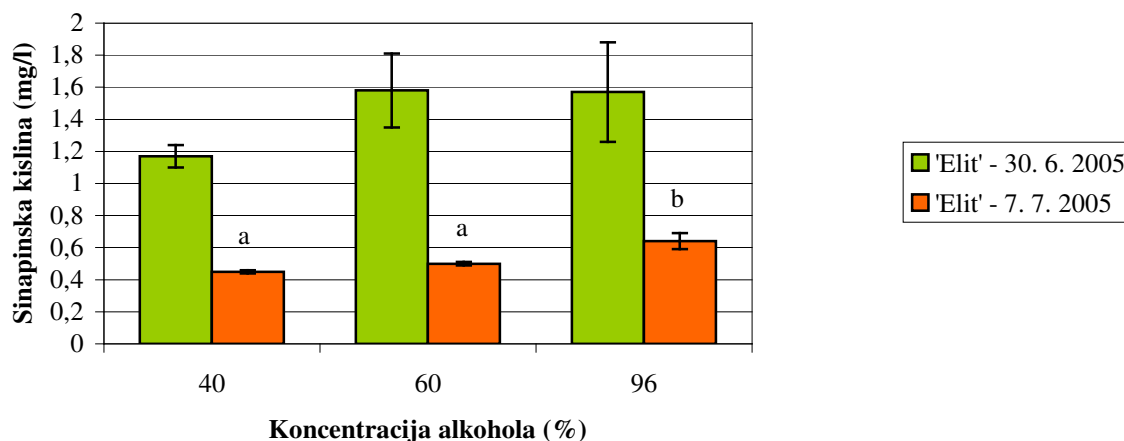
Slika 19: Povprečna vsebnost protokatehulne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

## 4.10 SINAPINSKA KISLINA

Sinapinsko kislino, ki spada med hidroksicimetne kisline, le redko najdemo v sadju in je običajno opažena le v sledovih. V majhnih količinah so jo tako našli v nekaterih citrusih, ananasu in paradižniku (Macheix in sod., 1990).



Slika 20: Povprečna vsebnost sinapinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



Slika 21: Povprečna vsebnost sinapinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

Tudi v naši raziskavi je bila izmed vseh fenolnih spojin vsebnost sinapinske kisline v orehovem likerju najnižja. Tako pri sorti 'Franquette' (Slika 20), kot pri sorti 'Elit' (Slika 21), so bile vsebnosti sinapinske kisline v prvem terminu višje kot v drugem. V prvem



terminu, pri sorti 'Franquette', so se vsebnosti sinapinske kisline med seboj statistično značilno razlikovale, in sicer smo najnižjo vsebnost izmerili v likerju iz 40 % etanola ( $0,74 \pm 0,24$  mg/l), višjo v likerju iz 60 % etanola ( $1,55 \pm 0,07$  mg/l) in najvišjo v likerju iz 96 % etanola ( $2,26 \pm 0,06$  mg/l). V drugem terminu so bile vsebnosti zelo nizke in med njimi ni bilo statistično značilnih razlik. Tudi pri sorti 'Elit' so vsebnosti sinapinske kisline v prvem terminu višje kot v drugem. Do statistično značilnih razlik med vsebnostmi sinapinske kisline je prišlo le v drugem terminu, kjer je vsebnost pri ekstrakciji s 96 % etanolom bila višja ( $0,64 \pm 0,05$  mg/l) in se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti pri ostalih dveh ekstrahiranjih. Pri ekstrakciji s 40 % etanolom pa smo izmerili najnižjo vrednost sinapinske kisline ( $0,45 \pm 0,01$  mg/l).

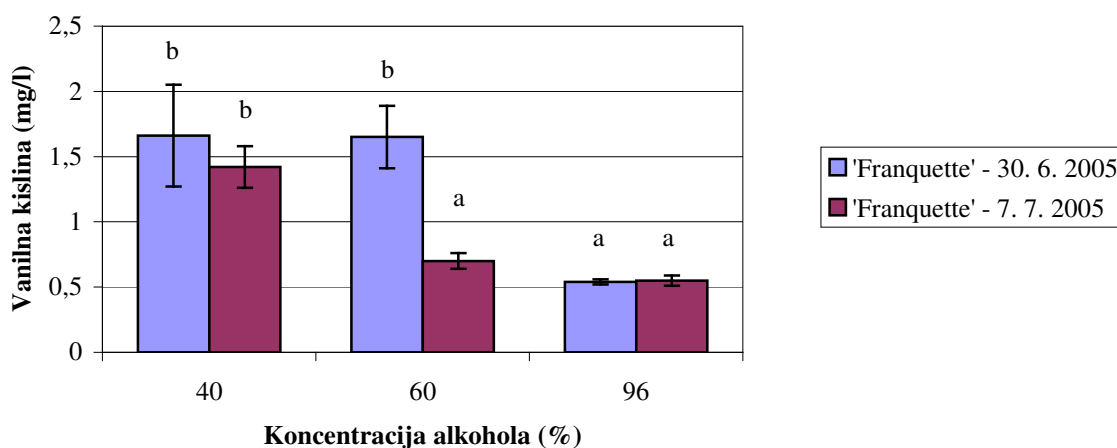
Tudi v orehu so vsebnosti sinapinske kisline zelo nizke. Colarič in sod. (2005) poročajo, da je med vsemi analiziranimi fenolnimi spojinami v jedrcu in kožici, ki pokriva jedrce oreha, imela sinapinska kislina najnižjo vrednost (0,05 in 2,17 mg/100 g jedrc in kožice). Vsebnost v kožici je na isti ravni, kot so jo izmerili Štampar in sod. (2006) v zeleni lupini oreha v avgustu. Poročali so, da so najvišjo vsebnost sinapinske kisline izmerili konec maja ( $99,6 \pm 22,3$  mg/100 g suhe mase), nato pa je vsebnost padala vse do avgusta ( $1,92 \pm 0,53$  mg/100 g suhe mase). Sinapinsko kislino so našli tudi v orehovem likerju iz sorte 'Elit', njena vsebnost je bila 1,2 mg/100 ml, kar je veliko več, kot smo izmerili v naši raziskavi.

#### 4.11 VANILNA KISLINA

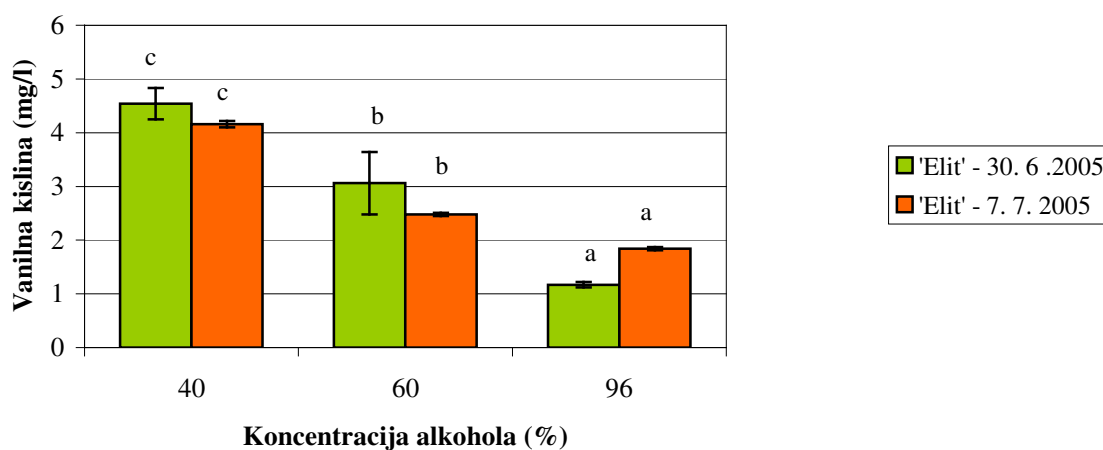
V orehovem likerju je vsebnost vanilne kisline, ki spada med hidroksibenzojske kisline, zelo nizka. Njena vsebnost je bila v obeh terminih in pri vseh koncentracijah alkohola nižja pri sorti 'Franquette' (Slika 24), kot pri sorti 'Elit' (Slika 25). Najvišjo vsebnost smo izmerili pri sorti 'Elit' v prvem terminu in pri 40 % koncentraciji etanola, in sicer  $4,54 \pm 0,29$  mg/l. Pri tej sorti so se pokazale statistično značilne razlike v vsebnosti v obeh terminih pri vseh koncentracijah etanola. Pri obeh sortah se je največ vanilne kisline izločilo pri ekstrakciji s 40 % etanolom najmanj pa pri ekstrakciji s 96 % etanolom. Pri sorti 'Franquette' so se v prvem terminu statistično značilne razlike v vsebnosti vanilne kisline pokazale le pri ekstrakciji s 96 % etanolom, kjer je bila vsebnost nižja kot pri ostalih dveh ekstrahiranjih. V drugem terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom je bila vsebnost vanilne kisline  $1,42 \pm 0,16$  mg/l in se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti pri ostalih dveh ekstrahiranjih. V prvem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom pa smo izmerili najnižjo vsebnost vanilne kisline, in sicer  $0,54 \pm 0,02$  mg/l.

O nizki vsebnosti vanilne kisline v jedrcu oreh je poročal že Prasad (1990), ki je ocenil, da je vsebnost vanilne kisline le 2-20  $\mu$ g/100 g jedrc. Solar in sod. (2006) so poročali, da je njena vsebnost v enoletnih poganjkih padala od konca maja, ko je bila vsebnost najvišja, pa

vse do avgusta, ko je bila izmerjena najnižja vsebnost. Štampar in sod. (2006) so poročali o vsebnosti vanilne kisline v zeleni lupini oreha, ki je bila najvišja konec maja ( $21,00 \pm 2,45$  mg /100 g suhe mase), nato pa je vsebnost močno padla v juniju in juliju ( $1,18 \pm 0,26$  mg /100 g suhe mase). Vanilno kislino so odkrili tudi v orehovem likerju iz sorte 'Elit', njena vsebnost je bila višja, kot smo jo izmerili v naši raziskavi, in sicer je bila vsebnost blizu 0,8 mg/100 ml likerja.



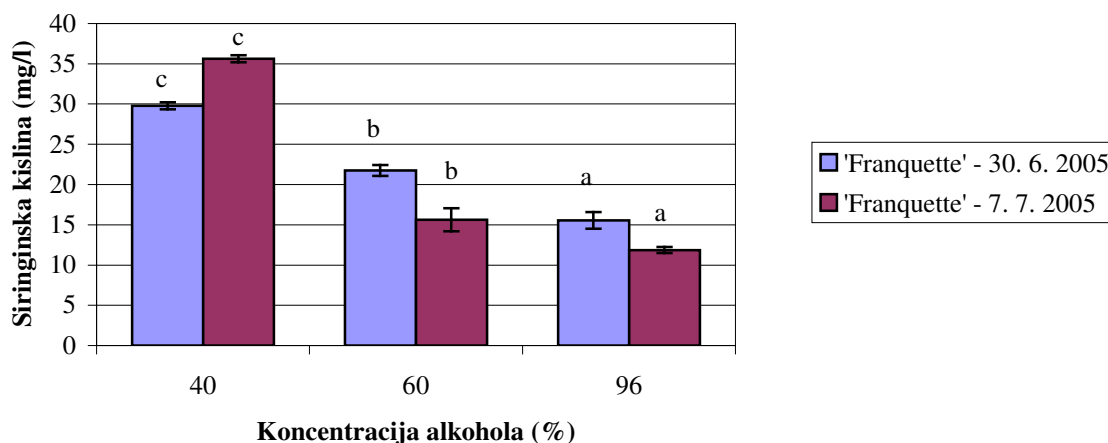
Slika 22: Povprečna vsebnost vanilne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .



Slika 23: Povprečna vsebnost vanilne kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

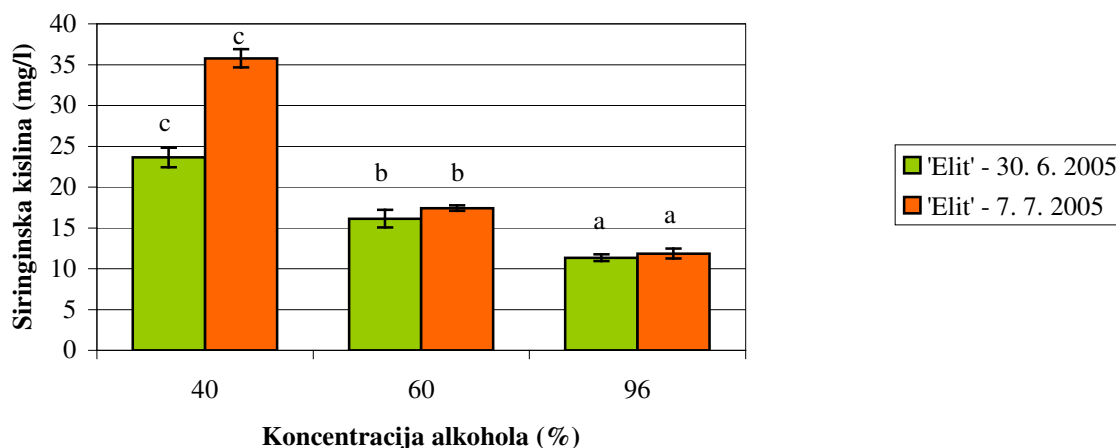
#### 4.12 SIRINGINSKA KISLINA

Poleg galne in elagne kisline, velik delež fenolnih spojin v orehovem likerju predstavlja siringinska kislina, ki spada med hidroksibenzojske kisline. Tako pri sorti 'Franquette' (Slika 24), kot pri sorti 'Elit' (Slika 25), so se jasno pokazale statistično značilne razlike v vsebnosti siringinske kisline v obeh terminih med vsemi koncentracijami etanola. Največjo vsebnost siringinske kisline smo izmerili v likerjih iz 40 % etanola, najmanjšo pa v likerjih iz 96 % etanola. Najvišjo vsebnost smo izmerili pri sorti 'Franquette' v drugem terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom, in sicer  $35,78 \pm 1,12$  mg/l. Najnižjo vsebnost siringinske kisline smo izmerili pri sorti 'Elit' v prvem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom, in sicer  $11,35 \pm 0,41$  mg/l likerja. Iz navedenih podatkov je razvidno, da je vsebnost siringinske kisline višja v prvem terminu kot v drugem in višja pri ekstrakcijah s 40 % etanolom kot pri ekstrakcijah s 96 % etanolom.



Slika 24: Povprečna vsebnost siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

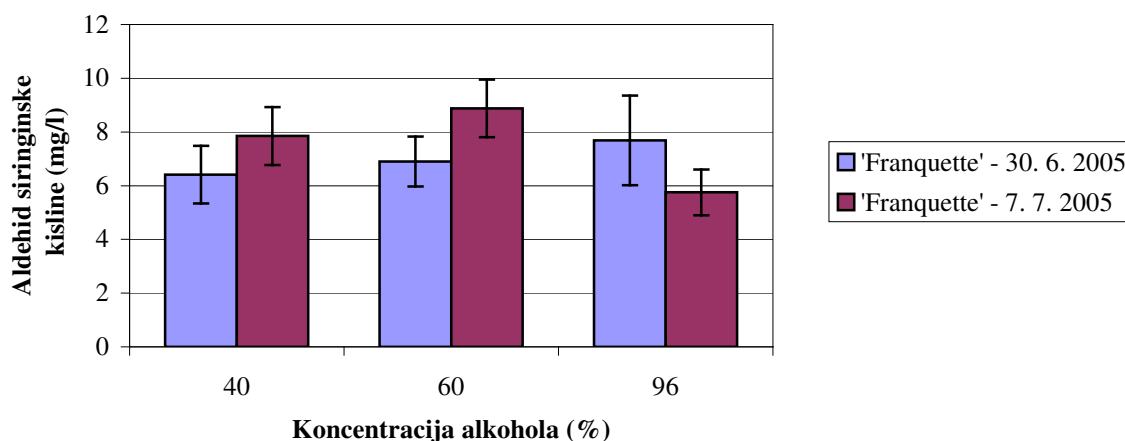
Štampar in sod. (2006) so v orehovem likerju iz sorte 'Elit' odkrili podobno vsebnost siringinske kisline (2,3 mg/100 ml), kot smo jo izmerili v naših raziskavah. V zeleni lupini oreha se med vsebnostjo siringinske kisline v posameznih terminih vzorčenja niso pokazale statistično značilne razlike, saj se je njena vsebnost gibala od  $13,1 \pm 2,85$  mg/100 g suhe snovi do  $17,3 \pm 2,29$  mg/100 g suhe snovi. V enoletnih poganjkih so Solar in sod. (2006) odkrili nizke vsebnosti siringinske kisline. Najnižjo vsebnost so izmerili konec maja, nato pa je vsebnost nekoliko narasla in se ni spreminjala v vseh ostalih terminih vzorčenja. Nasprotno pa so Colarič in sod. (2005) poročali, da ima siringinska kislina največjo vsebnost med vsemi analiziranimi fenolnimi spojinami v jedru oreha (33,83 mg/100 g jedrc) in rjavi kožici, ki jo pokriva (1003,24 mg/100 g kožice).



Slika 25: Povprečna vsebnost siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

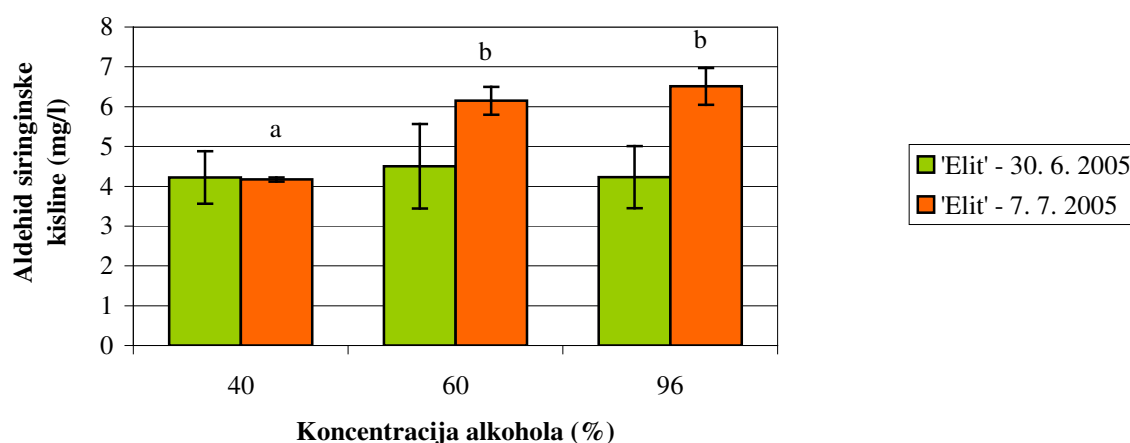
#### 4.13 ALDEHID SIRINGINSKE KISLINE

Aldehid siringinske kisline predstavlja le majhen delež vseh fenolnih spojin v orehovem likerju. O nizkih vsebnostih v jedrcu oreha je poročal že Prasad (1990), ki navaja, da je vsebnost aldehida siringinske kisline v jedrcu od 2 - 20  $\mu\text{g}/100$  g jedrc. Tudi Colarič in sod. (2005) so poročali o nizki vsebnosti te fenolne spojine v jedrcu (0,87 mg/100 g jedrc) in kožici, ki jedrce pokriva (27,34 mg/100 g kožic).



Slika 26: Povprečna vsebnost aldehida siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

V naši raziskavi smo odkrili, da orehov liker iz sorte 'Franquette' (Slika 26) vsebuje več aldehida siringinske kisline, kot liker iz sorte 'Elit' (Slika 27). Najvišjo vsebnost aldehida siringinske kisline smo izmerili pri sorti 'Franquette' v drugem terminu pri ekstrakciji s 60 % etanolom, in sicer  $8,88 \pm 1,07$  mg/l. Pri sorti 'Franquette' se v obeh terminih pri ekstrakcijah z različnimi koncentracijami etanola vsebnosti fenolnih snovi niso statistično značilno razlikovale, zato ne moremo govoriti o tem pri kateri koncentraciji etanola se izloči največ tega fenola. Najnižje vsebnosti smo izmerili pri sorti 'Elit' v prvem terminu, kjer so se vsebnosti gibale od  $4,22 \pm 0,66$  mg/l pri ekstrakciji s 40 % etanolom do  $4,50 \pm 1,06$  mg/l pri ekstrakciji s 60 % etanolom in se med seboj niso statistično značilno razlikovale. Statistično značilne razlike pa so se pokazale v drugem terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom, kjer je bila vsebnost nižja ( $4,17 \pm 0,05$  mg/l) in se je statistično značilno razlikovala od vsebnosti pri ekstrakcijah z ostalima dvema koncentracijama etanola.



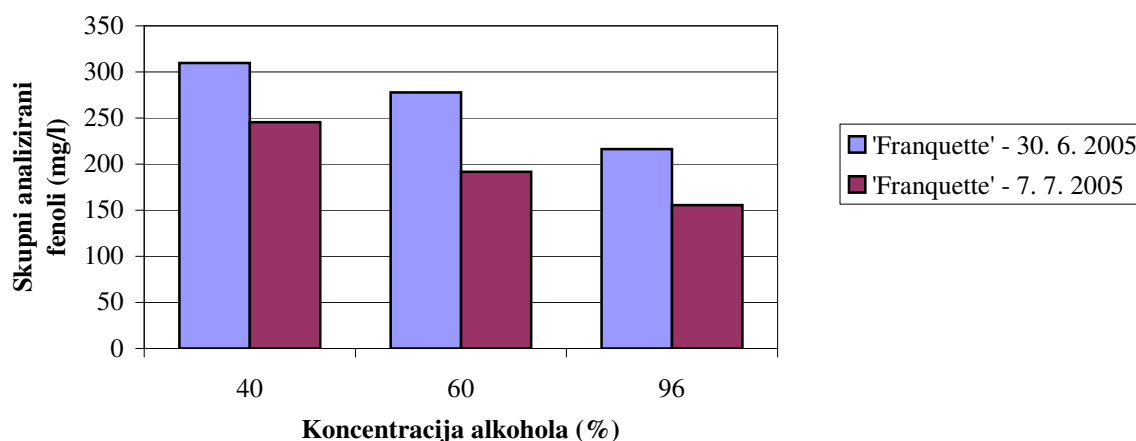
Slika 27: Povprečna vsebnost aldehida siringinske kisline  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' glede na oba termina obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom. Različne črke (a, b, c) označujejo statistično značilne razlike med različnimi koncentracijami etanola pri  $p < 0,05$ .

#### 4.14 SKUPNI ANALIZIRANI FENOLI

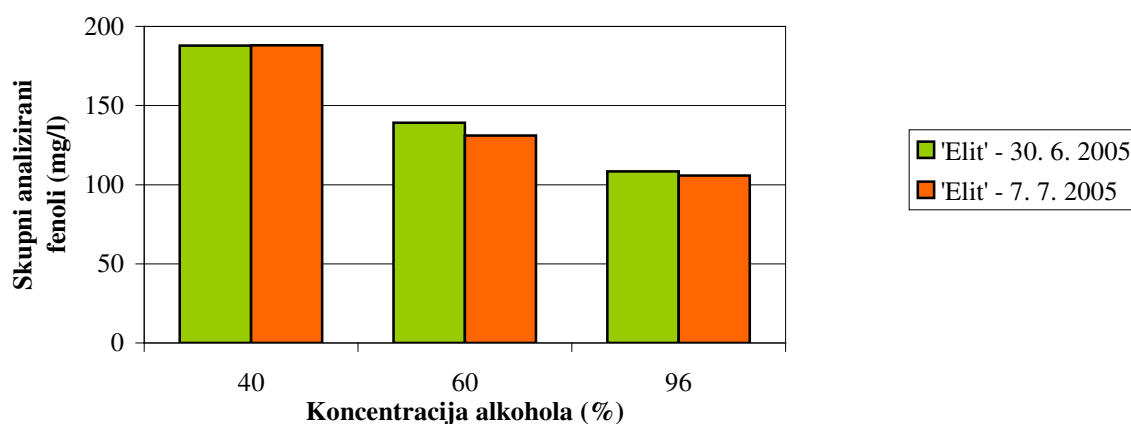
Vrednosti skupnih analiziranih fenolov smo dobili tako, da smo sešteli vrednosti trinajstih analiziranih fenolnih snovi, in sicer smo za vsako sorto in za vsak termin posebej sešteli vsebnosti fenolnih snovi pri ekstrakciji z posamezno koncentracijo etanola.

Najvišjo skupno vsebnost fenolnih snovi v orehovem likerju smo izmerili pri sorti 'Franquette' v prvem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom (Slika 28), in sicer  $309,56$  mg/l. Tudi sicer so bile vsebnosti najvišje pri sorti 'Franquette' v prvem terminu in nekoliko nižje v drugem terminu. Vsebnosti skupnih analiziranih fenolov pri sorti 'Franquette' so bile višje, kot pri sorti 'Elit' (Slika 29). Vsebnosti so pri sorti 'Elit' bile višje v prvem

terminu, kot v drugem terminu. Najnižja vsebnost skupnih fenolov, 105,79 mg/l, je bila izmerjena pri sorti 'Elit' v drugem terminu pri ekstrakciji s 96 % etanolom.



Slika 28: Vsebnost skupnih analiziranih fenolov (mg/l) pri sorti 'Franquette' v obeh terminih obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.



Slika 29: Vsebnost skupnih analiziranih fenolov (mg/l) pri sorti 'Elit' v obeh terminih obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

Pri sorti 'Franquette' bile so višje vsebnosti izmerjene v prvem terminu pri manj zrelih orehih, kot v drugem terminu. Pri sorti 'Elit', med posameznimi termini vzorčenja, nismo opazili bistvenih razlik v vsebnosti skupnih fenolov, saj so bile vsebnosti v obeh terminih skoraj enake. O vplivu relativne zrelosti orehov na vsebnost fenolnih spojin so poročali že Alamprese in sod. (2005) in Alamprese in Pompei (2005). V svojih študijah so navedli, da vsebnost skupnih fenolnih snovi v orehovem likerju pada z zrelostjo plodov, zato naj bi liker, ki je bil narejen iz bolj zrelih plodov, pokazal manjšo antioksidativno moč. Štampar in sod. (2006), ki so raziskovali vsebnost skupnih fenolov v zeleni lupini oreha sorte 'Elit', so o najvišji vsebnosti poročali v mesecu juniju, nato pa je vsebnost v juliju in avgustu

močno padla, iz česar lahko sklepamo, da je vsebnost skupnih fenolov v orehovem likerju višja v zgodnejših vzorčenjih, kot v poznejših.

Vsebnost skupnih analiziranih fenolov je odvisna tudi od koncentracije etanola s katerim smo ekstrahirali te snovi iz orehov. Pri obeh sortah in v obeh terminih smo največ skupnih fenolov izmerili v likerju iz 40 % etanola, nekoliko nižje vsebnosti v likerju iz 60 % etanola in najnižje vrednosti v likerju iz 96 % etanola. Višja vsebnost skupnih analiziranih fenolov v likerjih iz 40 % etanola je predvsem posledica višje vsebnost galne kisline, siringinske kisline in (+)-katehina pri ekstrakciji s 40 % etanolom, saj le-te največ doprinesejo k vsebnosti skupnih analiziranih fenolov. Ker pa orehov liker tradicionalno pripravljamo iz 40 % etanola, lahko potrdimo ugotovitev, ki so jo navedli Štampar in sod. (2005a), in sicer, da je tradicionalno pripravljen orehov liker bogat vir fenolnih snovi.

## 5 SKLEPI

V orehovem likerju, ki smo ga pripravili v dveh terminih (30. 6. 2005 in 7. 7. 2005), iz zelenih orehov sort 'Franquette' in 'Elit', ki smo jih ekstrahirali s 40 %, 60 % in 96 % etanolom, smo s pomočjo HPLC z PDA detektorjem analizirali 13 fenolnih spojin, to so: juglon, 1,4- naftokinon, kavina kislina, galna kislina, elagna kislina, klorogenska kislina, (+)- katehin, *p*- kumarna kislina, protokatehulna kislina, sinapinska kislina, vanilna kislina, siringinska kislina in aldehyd siringinske kisline.

Najvišjo vsebnost, izmed vseh fenolnih snovi v orehovem likerju, smo izmerili pri galni kislini ( $216,77 \pm 4,34$  mg/l) in njena vsebnost je lahko tudi več kot 10x večja od vsebnosti ostalih fenolnih spojin. Najnižjo pa je bila vsebnost juglona ( $0,005 \pm 0,00023$  mg/l).

Sorta 'Franquette' je boljši vir fenolnih spojin, kot sorta 'Elit'. Izmed vseh 13 analiziranih fenolnih spojin, sta bili le vsebnosti vanilne kisline in juglona višji pri sorti 'Elit,' kot pri sorti 'Franquette'. Sorta značilno vpliva na vsebnost fenolnih spojin v orehovem likerju.

Liker smo naredili iz zelenih orehov, nabranih v dveh terminih: 30. 6. 2005 in 7. 7. 2005. Najvišje vsebnosti posameznih fenolnih spojin smo izmerili v prvem terminu, medtem ko so v drugem terminu nekoliko višje vsebnosti dosegle elagna kislina in aldehyd siringinske kisline pri obeh sortah, juglon pri sorti 'Franquette' in siringinska kislina pri sorti 'Elit'. Pri sorti 'Franquette' se je več skupnih analiziranih fenolov izločilo v prvem terminu, medtem ko je bila v drugem terminu vsebnost bistveno nižja. Pri sorti 'Elit' se vsebnost skupnih analiziranih fenolov, med terminoma, ni bistveno razlikovala.

Orehov liker smo pripravili iz treh koncentracij alkohola: 40 %, 60 % in 96 % etanola. Pri ekstrakcijah s 40 % etanolom so bile najvišje vsebnosti siringinske kisline, vanilne kisline, (+)-katehina, klorogenske kisline, galne kisline in juglona. Pri ekstrakcijah z višjimi koncentracijami etanola pa se je ekstrahiralo več 1,4- naftokinona, elagne kisline, *p*-kumarne kisline, protokatehulne kisline, sinapinske kisline in aldehyda siringinske kisline. Največ skupnih fenolov se je ekstrahiralo v likerju iz 40 % etanola, ki ga uporabljamo tudi za tradicionalno pripravo orehovega likerja.

Razlike v vsebnosti fenolnih snovi v orehovem likerju pa niso le rezultat sorte oreha, zrelosti plodov oreha in koncentracije alkohola, s katerim smo jih ekstrahirali iz plodov, ampak so tudi rezultat različnih fenoloških dejavnikov, ki so vplivali na vsebnost fenolnih snovi v plodovih oreha.

Sklepna misel naše raziskave je, da je orehov liker, kljub tradicionalnem načinu proizvodnje, bogat vir fenolnih snovi.



## 6 POVZETEK

V diplomskem delu, z naslovom Analiza fenolnih snovi v orehovem likerju, smo analizirali vsebnost fenolnih snovi v tradicionalno pripravljenem orehovem likerju.

Za pripravo likerja smo uporabili plodove navadnega oreha (*Juglans regia* L.) sort 'Franquette' in 'Elit', ki smo jih nabrali na Raziskovalnem polju za lupinarje v Mariboru. Mlade, nezrele, zelene orehe obeh sort smo obirali v dveh terminih - prvi termin obiranja je bil 30. 6. 2005, drugi pa 7. 7. 2005. Za ekstrakcijo fenolnih snovi iz orehov smo uporabili 40 %, 60 % in 96 % etanol. Preučevali smo vpliv sorte, termina obiranja oziroma zrelosti plodov in vpliv koncentracije etanola na vsebnost fenolnih snovi v orehovem likerju.

S pomočjo HPLC (tekočinske kromatografije visoke ločljivosti) s PDA detektorjem smo analizirali 13 fenolnih spojin: juglon, 1,4-naftokinon, kavina kislina, galna kislina, elagna kislina, klorogenska kislina, (+)-katehin, *p*-kumarna kislina, protokatehulna kislina, sinapinska kislina, vanilna kislina, siringinska kislina in aldehyd siringinske kisline.

Med vsemi analiziranimi fenolnimi spojinami smo izmerili najvišjo vsebnost galne kisline pri sorti 'Franquette' v prvem terminu pri ekstrakciji s 40 % etanolom, medtem ko je bila vsebnost ostalih fenolnih snovi nekajkrat nižja. Pomemben delež analiziranih fenolnih snovi predstavljajo tudi siringinska kislina, elagna kislina in (+)-katehin. Posebej nizka pa je pri obeh sortah bila vsebnost juglona, ki je glavna fenolna snov v zelenih delih oreha, v likerju pa je bila njegova vsebnost tudi do tisočkrat manjša od vsebnosti ostalih fenolov.

Značilen vpliv na vsebnost fenolnih snovi je imela tudi sorta, iz katere smo pripravili liker. V likerju iz sorte 'Franquette' je bila izražena višja raven glavnih fenolnih snovi, kot pri sorti 'Elit' - le vsebnost juglona in vanilne kisline je bila nekoliko višja pri sorti 'Elit'. Tudi vsebnost skupnih analiziranih fenolov je bila v obeh terminih in pri vseh koncentracijah etanola višja pri sorti 'Franquette', kot pri sorti 'Elit'.

Eden od dejavnikov, ki vpliva na vsebnost fenolnih snovi v orehovem likerju, je zrelost plodov oziroma termin obiranja zelenih plodov. Že Alamprese in Pompei (2005) sta navedla, da je relativna zrelost plodov oreha pomemben parameter pri proizvodnji orehovega likerja, in da je vsebnost fenolnih snovi višja v likerju pripravljenem iz manj zrelih orehov. V naši raziskavi smo to trditev potrdili, saj je bila vsebnost skupnih analiziranih fenolnih snovi v likerju iz sorte 'Franquette', pripravljenem konec junija, višja kot v likerju, ki smo ga pripravili teden dni kasneje. Pri sorti 'Elit' pa je bila vsebnost v obeh terminih približno enaka – niso se pokazale razlike v vsebnosti fenolov, glede na zrelost plodov. Glede na vsebnost posameznih fenolnih snovi pa je, v drugem terminu vzorčenja, bila višja le vsebnost elagne kisline in aldehyda siringinske kisline pri obeh

sortah, juglona pri sorti 'Franquette' in siringinske kisline pri sorti 'Elit', vsebnost vseh ostalih fenolnih snovi pa je bila višja v prvem terminu vzorčenja.

Vpliv koncentracije etanola na vsebnost fenolnih snovi v likerju je bil statistično značilen, saj se je pri nižjih koncentracijah etanola ekstrahiralo več fenolnih spojin. Največ galne kisline, siringinske kisline, vanilne kisline, (+)-katehina, klorogenske kisline in juglona je bilo v orehovem likerju iz 40 % etanola, vsebnost ostalih fenolnih snovi pa je bila višja pri višjih koncentracijah etanola (60 % in 96 %). Največ fenolnih snovi se je izločilo pri ekstrakciji s 40 % etanolom, ki ga uporabljamo za tradicionalno pripravo orehovega likerja.

Orehov liker je zdravilna pijača, ki kljub tradicionalnem načinu priprave predstavlja bogat vir fenolnih snovi, ki z svojim antioksidativnim delovanjem pozitivno vplivajo na zdravje ljudi.

## 7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589
- Agencija RS za okolje. 2005. Mesečni bilten 2005.  
<http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%c5%benica/mese%c4%8dni%20bilten>  
(12. 9. 2007)
- Alamprese C., Pompei C. 2005. Influence of processing variables on some characteristics of nocino liqueur. Food Chemistry, 92: 203-209
- Alamprese C., Pompei C., Scharamuzzi F. 2005. Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur. Food Chemistry, 90: 495-502
- Anderson J.K., Teuber S.S., Gobeille A., Cremin P., Waterhouse A.L., Steinberg F.M. 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. The Journal of Nutrition, 131, 11: 2837-2842
- Binder R.G., Benson M.E., Flath R.A. 1989. Eight 1,4-naphtoquinones from Juglans. Phytochemistry, 28, 10: 2799-2801
- Colarič M., Veberič R., Solar A., Hudina M., Štampar F. 2005. Phenolic Acids, Siringaldehyde, and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 16: 6390-6396
- Feldman E.B. 2002. The scientific Evidence for a Beneficial Health Relationship Between Walnuts and Coronary Heart Disease. The Journal of Nutrition, 132, 5: 1062S-1101S
- Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Plant phenolics. Oxford, Oxford Academic Press: 528-566
- Gordon M. H. 2003. Antioxidants. V: Encyclopedia of Food Science and Nutrition. 2nd edition. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 261-289

- Gunduc N., El S.N. 2003. Assessing Antioxidant Activities of Phenolic Compounds of Common Turkish Food and Drinks on In Vitro Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Food Science*, 68, 8: 2591-2595
- Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A.B., Haffner K., Baugerød H., Andersen L.F., Moskaug J., Jacobs D.R., Blomhoff R. 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132: 461-471
- Jakopič J., Colarič M., Veberič R., Hudina M., Solar A., Štampar F. 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolic content in walnut liqueur? *Food Chemistry*, 104: 100-105
- Kornsteiner M., Wagner K.H., Elmadfa I. 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98: 381-387
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. oktober. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Kris-Etherton P., Shaomei Y.P., Sabate J., Ratcliffe H.E., Zhao G., Etherton T.D. 1999. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 504S-511S
- Lee J., Koo N., Min D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 1: 21-33
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. 1990. *Fruit phenolics*. Boca Raton, CRS Press: 378 str.
- Ocepek R. 1995. *Oreh: pridelava in uporaba*. Ljubljana, Kmečki glas: 99 str.
- Pečavar A. 1998. *Osnove tekočinske kromatografije*. Ljubljana, Kemijski inštitut: 30 str.
- Prasad R.B.N. 2003. Walnuts and pecans. V: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd edition. Caballero B., Trugo L.C., Fingles P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 6071-6079
- Razpet M. *Oreh v prerezu*. 2002. Marko in spletni strežnik Oreh (8. 7. 2002)  
<http://oreh.pef.uni-lj.si/~markor/orehpresek.jpg> (1. 10. 2007)

- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436
- Schieber A., Keller P., Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Jurnal of Chromatography*, 904: 265- 273
- Solar A. 2004. "Lupinarji- splošni del". Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo (osebni vir, študijsko leto 2005/2006)
- Solar A., Colarič M., Hudina M., Štampar F. 2005. The phenolic content of walnut fruit as affected by cultivar and developmental stage. *ISHS Acta Horticulturae*, 705: 231-240
- Solar A., Colarič M., Usenik V., Štampar F. 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science*, 170: 453-461
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. V: *Plant Biochemistry*. Dey P.M., Harborne J.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 387-416
- Šircelj H. 2001. Ugotavljanje sušnega stresa pri jablani (*Malus domestica* Borkh.) z izbranimi biokemičnimi in fiziološkimi kazalci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 164 str.
- Štampar F., Solar A., Hudina M., Veberič R., Colarič M., Fabčič J. 2005a. Phenolics in walnut liqueur- traditional folk medicine. V: *FAV health 2005. International symposium on human health effects of fruits and vegetables*, Québec City, 17.- 21. avgust 2005. Québec, Canada: 52
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2005b. *Sadjarstvo*. Ljubljana, Kmečki glas: 416 str.
- Štampar F., Solar A., Hudina M., Veberič R., Colarič M. 2006. Traditional walnut liqueur - cocktail of phenolics. *Food Chemistry*, 95: 627-631
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8-9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107

Young I.S., Woodside J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 154 str.

## ZAHVALA

Ob zaključku pisanja diplomske naloge bi se rada zahvalila vsem, ki ste mi stali ob strani ter me vzpodbujali tekom študija in nastajanja diplomske naloge.

Posebno bi se rada zahvalila mentorju prof. dr. Franciju Štamparju in somentorju doc. dr. Robertu Veberiču za vodenje in vsestransko pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvala gre celotni Katedri za sadjarstvo za pomoč pri izdelavi orehovega likerja, še posebej Jerneji Jakopič za opravljene analize fenolnih snovi na HPLC in pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Hvala vsem domačim za vse spodbude in potrpežljivost tekom študija, še posebej v času pisanja diplomske naloge.

Hvala Alenki Zupančič (Črnič) in Petri Likar za prijateljstvo, spodbude in vso pomoč.

In seveda hvala tebi Niko za vse.

Še enkrat hvala vsem.

**PRILOGA A**

Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' v prvem terminu (30. 6. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

<b>% alkohola</b>	<b>40%</b>	<b>60%</b>	<b>96%</b>
<b>fenolna spojina</b>			
JUGLON x 1000 (mg/l)	15,43 $\pm$ 3,65	15,32 $\pm$ 2,19	5 $\pm$ 0,23
1,4-NAFTOKINON (mg/l)	2,29 $\pm$ 0,34	2,77 $\pm$ 0,03	4,13 $\pm$ 0,64
KAVINA KISLINA (mg/l)	1,65 $\pm$ 0,01	1,86 $\pm$ 0,08	1,38 $\pm$ 0,09
GALNA KISLINA	216,77 $\pm$ 4,34	183,14 $\pm$ 3,71	129,2 $\pm$ 6,22
ELAGNA KISLINA (mg/l)	15,65 $\pm$ 3,33	27,9 $\pm$ 4,19	26,75 $\pm$ 4,81
KLOROGENSKA KISLINA (mg/l)	3,22 $\pm$ 0,04	2,13 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,08
(+)-KATEHIN (mg/l)	20,69 $\pm$ 0,47	14,67 $\pm$ 0,21	9,62 $\pm$ 0,68
<i>p</i> -KUMARNA KISLINA (mg/l)	3,31 $\pm$ 0,12	4,6 $\pm$ 0,12	5,13 $\pm$ 0,21
PROTOKATEHULNA KISLINA (mg/l)	7,4 $\pm$ 0,13	8,75 $\pm$ 0,52	12,87 $\pm$ 0,36
SINAPINSKA KISLINA (mg/l)	0,74 $\pm$ 0,24	1,55 $\pm$ 0,07	2,26 $\pm$ 0,06
VANILNA KISLINA (mg/l)	1,66 $\pm$ 0,39	1,65 $\pm$ 0,24	0,54 $\pm$ 0,02
SIRINGINSKA KISLINA (mg/l)	29,78 $\pm$ 0,43	21,73 $\pm$ 0,67	15,55 $\pm$ 1,04
ALDEHID SIRINGINSKE KISLINE (mg/l)	6,41 $\pm$ 1,07	6,9 $\pm$ 0,93	7,69 $\pm$ 1,67
SKUPAJ (mg/l)	309,56	277,67	216,24



**PRILOGA B**

Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Franquette' v drugem terminu (7. 7. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

<b>fenolna spojina</b>	<b>% alkohola</b>	<b>40%</b>	<b>60%</b>	<b>96%</b>
JUGLON x 1000 (mg/l)		22,08 $\pm$ 5,02	28,05 $\pm$ 5,98	29,52 $\pm$ 3,97
1,4-NAFTOKINON (mg/l)		0,8 $\pm$ 0,06	1,52 $\pm$ 0,18	2,64 $\pm$ 0,16
KAVINA KISLINA (mg/l)		1,29 $\pm$ 0,04	1,32 $\pm$ 0,13	1,3 $\pm$ 0,04
GALNA KISLINA (mg/l)		157,93 $\pm$ 5,21	124,11 $\pm$ 12,57	87,07 $\pm$ 5,53
ELAGNA KISLINA (mg/l)		15,95 $\pm$ 0,75	21,38 $\pm$ 3,94	25,66 $\pm$ 1,61
KLOROGENSKA KISLINA (mg/l)		1,75 $\pm$ 0,14	0,5 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,01
(+)-KATEHIN (mg/l)		14,21 $\pm$ 0,87	7,72 $\pm$ 0,59	6,84 $\pm$ 0,01
<i>p</i> -KUMARNA KISLINA (mg/l)		2,39 $\pm$ 0,13	2,62 $\pm$ 0,07	3,01 $\pm$ 0,05
PROTOKATEHULNA KISLINA (mg/l)		5,66 $\pm$ 0,28	6,72 $\pm$ 0,56	9,83 $\pm$ 0,17
SINAPINSKA KISLINA (mg/l)		0,49 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,14
VANILNA KISLINA (mg/l)		1,42 $\pm$ 0,16	0,7 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,04
SIRINGINSKA KISLINA (mg/l)		35,61 $\pm$ 0,43	15,65 $\pm$ 1,43	11,88 $\pm$ 0,36
ALDEHID SIRINGINSKE KISLINE (mg/l)		7,85 $\pm$ 1,08	8,88 $\pm$ 1,07	5,75 $\pm$ 0,85
SKUPAJ (mg/l)		245,37	191,69	155,43

**PRILOGA C**

Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' v prvem terminu (30. 6. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

<b>fenolne spojine</b>	<b>% alkohola</b>	<b>40%</b>	<b>60%</b>	<b>96%</b>
JUGLON x 1000 (mg/l)		42,03 $\pm$ 2,69	28,36 $\pm$ 5,35	10,81 $\pm$ 0,47
1,4-NAFTOKINON (mg/l)		1,46 $\pm$ 0,11	1,83 $\pm$ 0,23	2,97 $\pm$ 0,12
KAVINA KISLINA (mg/l)		1,69 $\pm$ 0,15	1,57 $\pm$ 0,09	1,33 $\pm$ 0,05
GALNA KISLINA (mg/l)		118,91 $\pm$ 6,18	82,71 $\pm$ 3,41	56,47 $\pm$ 1,49
ELAGNA KISLINA (mg/l)		7,92 $\pm$ 1,53	9,82 $\pm$ 1,32	13,1 $\pm$ 3,18
KLOROGENSKA KISLINA (mg/l)		2,26 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,26	0,5 $\pm$ 0,02
(+)-KATEHIN (mg/l)		15,38 $\pm$ 0,6	9,18 $\pm$ 1,76	4,58 $\pm$ 0,17
<i>p</i> -KUMARNA KISLINA (mg/l)		2,86 $\pm$ 0,12	3,19 $\pm$ 0,09	4,19 $\pm$ 0,21
PROTOKATEHULNA KISLINA (mg/l)		3,72 $\pm$ 0,41	4,38 $\pm$ 0,21	6,92 $\pm$ 0,67
SINAPINSKA KISLINA (mg/l)		1,17 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,23	1,57 $\pm$ 0,31
VANILNA KISLINA (mg/l)		4,54 $\pm$ 0,29	3,06 $\pm$ 0,58	1,17 $\pm$ 0,05
SIRINGINSKA KISLINA (mg/l)		23,64 $\pm$ 1,19	16,12 $\pm$ 1,08	11,35 $\pm$ 0,41
ALDEHID SIRINGINSKE KISLINE (mg/l)		4,22 $\pm$ 0,66	4,5 $\pm$ 1,06	4,23 $\pm$ 0,78
SKUPAJ (mg/l)		187,81	139,23	108,39

**PRILOGA D**

Povprečna vsebnost 13 analiziranih fenolnih spojin  $\pm$  standardna napaka v mg/l likerja pri sorti 'Elit' v drugem terminu (7. 7. 2005) obiranja zelenih plodov in ekstrakciji s 40 %, 60 % in 96 % etanolom.

<b>fenolne spojine</b>	<b>% alkohola</b>	<b>40%</b>	<b>60%</b>	<b>96%</b>
JUGLON x 1000 (mg/l)		29,1 $\pm$ 1,73	27,65 $\pm$ 4,6	24,29 $\pm$ 2,22
1,4-NAFTOKINON (mg/l)		1,57 $\pm$ 0,05	1,81 $\pm$ 0,09	1,93 $\pm$ 0,06
KAVINA KISLINA (mg/l)		1,51 $\pm$ 0,03	1,71 $\pm$ 0,03	1,53 $\pm$ 0,05
GALNA KISLINA (mg/l)		112,45 $\pm$ 0,63	78,76 $\pm$ 2,26	55,16 $\pm$ 2,57
ELAGNA KISLINA (mg/l)		9,2 $\pm$ 0,41	11,41 $\pm$ 0,59	12,31 $\pm$ 0,46
KLOROGENSKA KISLINA (mg/l)		1,46 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01
(+)-KATEHIN (mg/l)		11,85 $\pm$ 0,16	4,3 $\pm$ 0,04	3,55 $\pm$ 0,13
<i>p</i> -KUMARNA KISLINA (mg/l)		1,87 $\pm$ 0,12	2,54 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,35
PROTOKATEHULNA KISLINA (mg/l)		3,59 $\pm$ 0,09	3,6 $\pm$ 0,13	6,56 $\pm$ 0,28
SINAPINSKA KISLINA (mg/l)		0,45 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,05
VANILNA KISLINA (mg/l)		4,16 $\pm$ 0,06	2,48 $\pm$ 0,03	1,84 $\pm$ 0,03
SIRINGINSKA KISLINA (mg/l)		35,78 $\pm$ 1,12	17,43 $\pm$ 0,35	11,86 $\pm$ 0,6
ALDEHID SIRINGINSKE KISLINE (mg/l)		4,17 $\pm$ 0,05	6,15 $\pm$ 0,35	6,51 $\pm$ 0,46
SKUPAJ (mg/l)		188,09	131,01	105,79