

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja REČNIK

**VPLIV KISLIN IN BAZ NA POTEK OKSIDACIJE V
MODELNIH LIPIDNIH SISTEMIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja REČNIK

**VPLIV KISLIN IN BAZ NA POTEK OKSIDACIJE V MODELNIH
LIPIDNIH SISTEMIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

**INFLUENCE OF ACIDS AND BASES ON THE OXIDATION
COURSE OF MODEL LIPID SYSTEMS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Blaža Cigića, za somentorico doc. dr. Natašo Šegatin in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentor: izr. prof. dr. Blaž Cigić

Somentorica: doc. dr. Nataša Šegatin

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anja Rečnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 664.3.094.3.097.8:577.115:544.3(043)=163.6
- KG rastlinska olja/modelni lipidni sistem/oksidacija lipidov/peroksidno število/antioksidanti
- AV REČNIK, Anja, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
- SA CIGIČ, Blaž (mentor)/ŠEGATIN, Nataša (somentorica)/ VIDRIH, Rajko (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2015
- IN VPLIV KISLIN IN BAZ NA POTEK OKSIDACIJE V MODELNIH LIPIDNIH SISTEMIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana)
- OP XII, 66 str., 8 pregl., 30 sl., 2 pril., 66 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V okviru magistrske naloge smo analizirali vpliv kislin in baz na tvorbo primarnih in sekundarnih produktov oksidacije v rastlinskih oljih in modelnih lipidnih sistemih. Za eksperimente smo uporabili laneno, sončnično, koruzno in rafinirano oljčno olje ter zmes gliceril-trioktanoata in metil-linolenata. V olja ter sintetično lipidno mešanico smo dodajali palmitinsko kislino, heksilamin, triheksilamin ter α -tokoferol in γ -tokoferol ter analizirali njihov vpliv na oksidacijo. Pripravljene vzorce smo inkubirali na 60 °C ter v določenih časovnih intervalih določali primarne produkte oksidacije s peroksidnim številom in tvorbo konjugiranih dienov, sekundarne produkte oksidacije pa smo določali s para-anizidinsko vrednostjo in tvorbo konjugiranih trienov. Ugotovili smo, da prosta palmitinska kislina v mešanicah lanenega in sončničnega olja ne pospešuje procesov oksidacije. Heksilamin in triheksilamina sta delovala kot antioksidanta. V milimolarnem območju sta upočasnila proces peroksidacije lipidov. Učinkovitejši je bil triheksilamin, kjer smo v določenih primerih določili tudi za več kot dva velikostna razreda manjšo tvorbo peroksidov kot v kontrolnih oljih. Z eksperimenti v modelnih lipidnih sistemih smo potrdili, da triheksilamin deluje kot antioksidant tudi v odsotnosti tokoferolov. Prav tako smo potrdili, da bazi heksilamin in triheksilamin sinergistično delujeta z γ -tokoferolom, medtem ko pri α -tokoferolu sinergističnih učinkov nismo zaznali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 664.3.094.3.097.8:577.115:544.3(043)=163.6
- CX vegetable oils/model lipid system/lipid oxidation/peroxide value/antioxidants
- AU REČNIK, Anja
- AA CIGIĆ, Blaž (supervisor)/ŠEGATIN, Nataša (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2015
- TY INFLUENCE OF ACIDS AND BASES ON THE OXIDATION COURSE OF MODEL LIPID SYSTEMS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Nutrition)
- NO XII, 66 p., 8 tab., 30 fig., 2 ann., 66 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Within the master thesis the influence of acids and bases on the formation of primary and secondary products of lipid oxidation in plant oils and model lipid systems was evaluated. Linseed, sunflower, corn and refined olive oil were used, as also the mixture of glycery-trioctanoate and methyl-linolenate. Palmitic acid, hexylamine, trihexylamine, α -tocopherol and γ -tocopherol were added into oils and mixture of synthetic lipids in order to evaluate their influence on oxidation. Samples were incubated at 60 °C and after chosen time intervals products of primary oxidation were determined by peroxide value and conjugated dienes, whereas p-anisidine value and conjugated trienes were determined to assess the concentration of secondary oxidation products. We have found out that free palmitic acid does increase the rate of peroxidation in the mixture of linseed and refined olive oil. Hexylamine and trihexylamine were good antioxidants in millimolar range. Trihexylamine was more efficient in decreasing the rate of peroxidation, resulting in even more than two orders of magnitude lower amount peroxides in certain oils. Experiments in model systems revealed that trihexylamine is an efficient antioxidant even in the absence of tocopherols. Both, hexylamine and trihexylamine acted synergistically with γ -tocopherol, whereas synergism was not observed in the presence of α -tocopherol.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LIPIDNA OKSIDACIJA	3
2.1.1 Mehanizem lipidne oksidacije.....	3
2.1.2 Maščobe, maščobne kisline in lipidna oksidacija.....	5
2.1.3 Vpliv oksidiranih maščob na zdravje.....	7
2.1.4 Preprečevanje lipidne oksidacije	8
2.2 TOKOFEROLI (VITAMIN E)	9
2.3 BAZE KOT ANTIOKSIDANTI	13
2.3.1 Heksilamin in triheksilamin.....	16
2.4 KARAKTERISTIKE NEKATERIH OLJ	18
2.4.1 Rafinirano oljčno olje	18
2.4.2 Rafinirano sončnično olje.....	18
2.4.3 Rafinirano koruzno olje	19
2.4.4 Laneno olje	19
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	21
3.1.1 Osnovni vzorci olj in modelnih lipidnih sistemov	21
3.1.2 Dodatki.....	21
3.1.3 Kemikalije, laboratorijska oprema in pribor.....	21

3.2	METODE	22
3.2.1	Priprava vzorcev in modelnih lipidnih sistemov.....	22
3.2.1.1	Poskus 1: Oksidacija lipidov – mešanica rafiniranega oljčnega olja in lanenega olja.....	23
3.2.1.2	Poskus 2: Oksidacija lipidov – laneno olje in rafinirano sončnično olje.....	23
3.2.1.3	Poskus 3: Oksidacija lipidov – rafinirano sončnično olje.....	23
3.2.1.4	Poskus 4: Oksidacija lipidov – rafinirano koruzno olje.....	24
3.2.1.5	Poskus 5: Oksidacija lipidov – modelni lipidni sistem 1 (MLS 1)	24
3.2.1.6	Poskus 6: oksidacija lipidov – modelni lipidni sistem 2 (MLS 2)	24
3.3	KEMIJSKE ANALIZE VZORCEV	25
3.3.1	Metode za merjenje lipidne oksidacije.....	25
3.3.2	Merjenje primarnih produktov oksidacije.....	26
3.3.2.1	Peroksidno število (PŠ).....	26
3.3.2.1.1	Določanje peroksidnega števila – spektrofotometrično določanje... ..	26
3.3.2.1.2	Umeritvena krivulja za perokside in priprava standardnih raztopin ..	27
3.3.2.2	Konjugirani dieni in trieni	28
3.3.2.2.1	Absorpcijski spektri v UV – spektrofotometrično določanje.....	29
3.3.3	Merjenje sekundarnih produktov oksidacije	29
3.3.3.1	Para-anizidinsko število (p-AV).....	29
3.3.3.1.1	Določanje para-anizidinskega števila – spektrofotometrično določanje	30
3.3.3.1.2	Umeritvena krivulja za aldehide in priprava standardnih raztopin ..	31
4	REZULTATI Z RAZPRAVO.....	33
4.1	REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ OSNOVNIH VZORCEV OLJA IN MODELNIH LIPIDNIH SISTEMOV	33
4.1.1	Rezultati meritev kemijskih analiz vzorcev mešanic rafiniranega oljčnega olja in lanenega olja	33
4.1.1.1	Peroksidi.....	33
4.1.1.2	p-anizidinsko število	36
4.1.1.3	Konjugirani dieni in trieni	38
4.1.2	Rezultati meritev kemijskih analiz vzorcev lanenega olja in rafiniranega sončničnega olja	41
4.1.2.1	Peroksidi.....	41
4.1.2.2	Karotenoidi.....	45

4.1.3	Rezultati meritev kemijskih analiz vzorcev rafiniranega sončničnega olja	48
4.1.3.1	Peroksidi.....	48
4.1.4	Rezultati kemijskih analiz vzorcev rafiniranega koruznega olja	50
4.1.4.1	Peroksidi.....	50
4.1.5	Rezultati kemijskih analiz vzorcev modelnega lipidnega sistema 1	52
4.1.5.1	Analiza vpliva triheksilamina v kombinaciji z α -tokoferolom na tvorbo peroksidov v modelnem lipidnem sistemu.....	53
4.1.6	Rezultati kemijskih analiz vzorcev modelnega lipidnega sistema 2	54
4.1.6.1	Analiza vpliva triheksilamina v kombinaciji z γ -tokoferolom na tvorbo peroksidov v modelnem lipidnem sistemu.....	54
4.1.6.2	Analiza vpliva heksilamina v kombinaciji z α -tokoferolom in γ -tokoferolom na tvorbo peroksidov v modelnem lipidnem sistemu.....	55
5	SKLEPI	57
6	POVZETEK	58
7	VIRI.....	60
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula α -tokoferola (NCBI, 2015a).	10
Slika 2: Strukturna formula γ -tokoferola (NCBI, 2015b).....	10
Slika 3: Strukturna formula etoksikvina (NCBI, 2015c).....	14
Slika 4: Strukturna formula spermina (NCBI, 2015č).....	15
Slika 5: Strukturna formula spermidina (NCBI, 2015d).	15
Slika 6: Strukturna formula heksilamina (RSC, 2015a).....	17
Slika 7: Strukturna formula triheksilamina (RSC, 2015b).	18
Slika 8: Umeritvena krivulja za določanje peroksidov s terciarnim butil-hidroperoksidom (t-BuOOH)	28
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje aldehydov: Reaktivnost aldehydov v p-anizidinskem testu.....	32
Slika 10: Vsebnost peroksidov v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).....	35
Slika 11: Vsebnost peroksidov v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).....	35
Slika 12: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).....	37
Slika 13: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).....	38
Slika 14: Konjugirani dieni v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).	39
Slika 15: Konjugirani trieni v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).	39
Slika 16: Konjugirani dieni v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).	40
Slika 17: Konjugirani trieni v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).	40
Slika 18: Vsebnost peroksidov v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in heksilamina (HA).	44

Slika 19: Vsebnost peroksidov v rafiniranem sončničnem olju (SO) po inkubaciji na 60 °C. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in heksilamina (HA).	44
Slika 20: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 0. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA).	46
Slika 21: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 0. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA).	46
Slika 22: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 3. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA).	46
Slika 23: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 3. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA).	47
Slika 24: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 5. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA).	47
Slika 25: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 5. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA).	47
Slika 26: Vsebnost peroksidov v rafiniranem sončničnem olju (SO) po inkubaciji na 60 °C. Olju je bil dodan γ -tokoferol (γ -T) in različne koncentracije heksilamina (HA).	49
Slika 27: Vsebnost peroksidov v rafiniranem koruznem olju (KO) po inkubaciji na 60 °C. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA) in triheksilamina (THA).	52
Slika 28: Vsebnost peroksidov v modelnem lipidnem sistemu 1 (MLS 1) po inkubaciji na 60 °C. Modelnemu lipidnemu sistemu je bil dodan α -tokoferol (α -T) in različne koncentracije triheksilamina (THA).	54
Slika 29: Vsebnost peroksidov v modelnem lipidnem sistemu 2 (MLS 2) po inkubaciji na 60 °C. Modelnemu lipidnemu sistemu je bil dodan γ -tokoferol (γ -T) in triheksilamin (THA).	55
Slika 30: Vsebnost peroksidov v modelnem lipidnem sistemu 2 (MLS 2) po inkubaciji na 60 °C. Modelnemu lipidnemu sistemu so bili dodani γ -tokoferol (γ -T), α -tokoferol (α -T) in heksilamin (HA).	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost skupnih tokoferolov v nekaterih oljih in masteh (mg/kg) (Gunstone, 1996)	11
Preglednica 2: Vsebnost (v %) nasičenih maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (Kostik in sod., 2013)	19
Preglednica 3: Vsebnost (v %) nenasičenih maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (Kostik in sod., 2013)	20
Preglednica 4: Vsebnost (v %) skupnih nasičenih maščobnih kislin (NMK), mononenasičenih maščobnih kislin (MNMK), polinenasičenih maščobnih kislin (PNMK) in vrednosti indeksa nasičenih/nenasičenih maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (Kostik in sod., 2013)	20
Preglednica 5: Vsebnost tokoferolov (v mg/100g) v nekaterih rastlinskih oljih (Schwartz in sod., 2008).....	20
Preglednica 6: Eksperimentalni načrt za sestavo vzorcev modelnega lipidnega sistema (MLS1).....	24
Preglednica 7: Eksperimentalni načrt za sestavo vzorcev modelnega lipidnega sistema (MLS2).....	25
Preglednica 8: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje peroksidov s terciarnim butil- hidroperoksidom (t-BuOOH).....	28

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v različnih vzorcih olja in modelnih lipidnih sistemov

Priloga A1: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Priloga A2: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Priloga A3: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v lanenem olju (LO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Priloga A4: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v rafiniranem sončničnem olju (SO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Priloga A5: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v rafiniranem sončničnem olju (SO) z dodanim γ -T in različnimi koncentracijami HA po inkubaciji na 60 °C

Priloga A6: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v koruznem olju (KO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Priloga A7: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v modelnem lipidnem sistemu 1 (MLS 1) z dodanim α -T in različnimi koncentracijami THA po inkubaciji na 60 °C

Priloga A8: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v modelnem lipidnem sistemu 2 (MLS 2) z dodanim α -T, γ -T, THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Priloga B: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah lanenega in rafiniranega oljčnega olja

Priloga B1: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Priloga B2: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

α -T	alfa-tokoferol
β -T	beta-tokoferol
δ -T	delta-tokoferol
γ -T	gama-tokoferol
BHA	butil hidroksi anizol
BHT	butil hidroksi toluen
GTO	gliceril trioktanoat
HA	heksilamin
KO	rafinirano koruzno olje
LO	laneno olje
LOO	mešanica lanenega in rafiniranega oljčnega olja
MK	maščobna kislina
MLS	modelni lipidni sistem
OO	rafinirano oljčno olje
p-AV	para-anizidinska vrednost
PK	palmitinska kislina
PŠ	peroksidno število
SO	rafinirano sončnično olje
TAG	triacilglicerol
TBHQ	terciarni butil hidrokinon
THA	triheksilamin

1 UVOD

Prehranski lipidi oz. maščobe, ki so naravno prisotne v surovi hrani ali hrani dodane med procesiranjem, imajo pomembno vlogo pri okusu in prehranski ter hranilni vrednosti. Rastlinska olja so ena glavnih skupin živil v humani prehrani, saj predstavljajo približno 25 % energijskega vnosa hrane. Maščobe nam zagotavljajo energijo, esencialna hranila in bioaktivne komponente.

Znano je, da je za naše zdravje pomembno uživanje maščob in olj, bogatih s polinenasičenimi oz. večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami. ω -6 in ω -3 maščobne kisline uvrščamo med esencialna živila, ki jih naše telo ne more samo sintetizirati in so nujno potrebne za normalno delovanje organizma.

Polinenasičene maščobne kisline so zaradi svoje zgradbe bolj podvržene procesom lipidne oksidacije kot enkrat nenasičene ali nasičene maščobne kisline.

Lipidna oksidacija predstavlja glavni vzrok poslabšanja kakovosti živil in je že dolgo izziv proizvajalcem živil in znanstvenikom, ki se ukvarjajo z živilom. Večina lipidov je dovzetnih za oksidacijo zaradi nenasičenih maščobnih kislin. Lipidi so dovzetni za oksidativne procese v prisotnosti katalitičnih sistemov, kot so svetloba, toplota, encimi, kovine, metaloproteini in mikroorganizmi. (Shahidi in Zhong, 2005; Chen in sod., 2011; Kostik in sod., 2013).

Produkti, ki se tvorijo v oksidiranih lipidih vključujejo številne proste radikalne zvrsti, primarne produkte oksidacije, kot so hidroperoksidi, sekundarne produkte oksidacije kot so aldehidi, ogljikovodiki, ketoni in epoksidi. Ti oksidativni procesi prispevajo k razvoju sprememb okusa in k izgubi esencialnih aminokislin, nepolarnih vitaminov in drugih bioaktivnih komponent. Vse to vpliva na proizvod, ki postane nesprejemljiv za potrošnika. Med produkti lipidne oksidacije so lahko tudi toksične komponente, ki negativno vplivajo na biološka tkiva in strukture.

Lipidi so lahko podvrženi različnim tipom oksidacij: avtooksidaciji, foto-oksidaciji, termični oksidaciji in encimski oksidaciji pod različnimi pogoji, ki ponavadi vključujejo nekatere tipe prostih radikalov ali kisikovih zvrsti (Shahidi in Zhong, 2005; Chen in sod., 2011).

Lipidno oksidacijo lahko preprečujemo z izključitvijo kisika ali pa z dodatkom antioksidantov. Dodatek antioksidantov je ena izmed učinkovitih metod preprečevanja lipidne oksidacije.

Nekatere študije so pokazale, da proste kisline in baze (nepolarni amini) lahko vplivajo na potek oksidacije lipidov. Nekateri amini (npr. etoksikvin) se že dolgo uporabljajo kot antioksidanti v lipidnih sistemih. Mehanizem delovanja aminov kot antioksidantov še ni popolnoma pojasnen. Rezultati preteklih študij pa kažejo, da bi antioksidativno aktivnost lahko pripisali kelatorskim lastnostim aminov ali pretvorbi aminov v antioksidante med inkubacijo v olju. Možen mehanizem delovanja baz kot antioksidantov je tudi pospešitev reakcije tokoferolov s prostimi radikali.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru magistrske naloge smo želeli preveriti vpliv kislin in baz na tvorbo primarnih in sekundarnih produktov oksidacije v rastlinskih oljih in modelnih lipidnih sistemih. Zanimala nas je koncentracijska odvisnost učinkovitosti uporabljenih aminov kot antioksidantov, prav tako pa smo želeli ugotoviti, ali amini sinergistično delujejo z antioksidanti, ki so že prisotni v oljih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da bodo amini upočasnili oksidacijo lipidov rastlinskih oljih in modelnih lipidnih sistemih. Predpostavljamo, da bo prosta palmitinska kislina pospešila oksidacijo lipidov v rastlinskih oljih. Predpostavljamo tudi, da bomo ugotovili sinergistično delovanje med amini in tokoferoli.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LIPIDNA OKSIDACIJA

Najpogostejše spremembe triacilglicerolov v živilih:

- hidrolitske in
- oksidativne.

Hidrolitske spremembe maščob potekajo pod vplivom lipaz, ki se nahajajo v živilih (sadje, zelenjava, oljarice, žitarice, mleko), v prebavnem traktu sesalcev oziroma jih izločajo mikroorganizmi. Hidrolitske spremembe maščob nastopijo tudi kot kemijska hidroliza pri procesiranju živil, predvsem pri segrevanju v kislem mediju.

Oksidativne spremembe maščob v hrani obsegajo oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin kot so oleinska, linolna in linolenska v hidroperokside, ki se nato razgrajujejo v različne spojine (Zelenik-Blatnik, 1992). Oksidativne spremembe povzročajo spremembe v aromi maščobnih živil, ki jih zaznavamo kot aromo po žarkem, ribah, kovini ali lepenki (Belitz in sod., 2009).

Lipidna oksidacija zajema skupek avtokatalitičnih reakcij. Možnih je več simultanih reakcij zaradi delovanja kisika, svetlobe, katalizatorjev in encimov. Avtooksidacija je verižna reakcija, ki nastane zaradi kisika v zraku, ki vpliva na nenasičene maščobne kisline in je odvisna od prostih radikalov. Poteka vse dokler nastajajo prosti radikali. Konča se, ko se prosti radikali stabilizirajo ali se iz njih prično tvoriti nereaktivne molekule. Ko se avtooksidacija enkrat prične, se lahko nadaljuje v temi. Fotooksidacija je pogojena z nastankom močno reaktivnega singletnega kisika na svetlobi. Termična oksidacija je posledica povišane temperature okolja. Ta proces je še posebej izrazit pri segrevanju olja v procesih kot so npr. cvrenje ob prisotnosti kisika (Roman in sod., 2013).

2.1.1 Mehanizem lipidne oksidacije

Avtooksidacija poteka progresivno preko več stopenj in se ponavlja začne z radikalnim verižnim mehanizmom, ki vključuje naslednje stopnje:

- Iniciacijo (začetek)



Energija v obliki toplote, svetlobe ali drugega sevanja s pomočjo katalizatorja odcepi vodikov atom od maščobne kisline. Po odstranitvi vodikovega atoma z maščobne kisline (proste ali zaestrene) nastane prosti radikal (reaktivna spojina z nesparjenim elektronom).

Iniciacija procesa se lahko začne tudi s cepitvijo hidroperoksida, kot je predstavljeno v enačbi (2). To je začetek ali iniciacija.

- propagacijo (širjenje)
 - $L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet$... (3)
 - $LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L$... (4)
 - $LO\bullet + LH \rightarrow LOH + L\bullet$... (5)

Po adiciji kisika na prosti radikal, ki je nastal iz maščobne kisline, se tvori peroksilni radikal (ROO). Ta reagira z maščobno kislino in ji odvzame vodikov atom. Pri tem nastane hidroperoksid (ROOH) in nov maščobnokislinski radikal. To je propagacija.

- terminacijo (zaključek)
 - $L\bullet + L\bullet \rightarrow LL$... (6)
 - $L\bullet + LO\bullet \rightarrow LOL$... (7)
 - $L\bullet + LOO\bullet \rightarrow LOOL$... (8)
 - $LOO\bullet + LOO\bullet \rightarrow LOOL + O_2$... (9)

Reakcija dveh prostih radikalov rezultira v neradikalnem produktu. To je terminacija (Roman in sod., 2013).

Hidroperoksidi vstopajo v vrsto reakcij, ki vodijo do več prostih radikalov in stabilnih končnih produktov. Ti končni produkti obsegajo karbonilne spojine s kratko verigo, ki povzročajo žarek vonj in stranske reakcije, ki vodijo do poslabšanja kvalitete.

Hidroperoksidi so pomembni primarni produkti oksidacije maščob. So nehlapni, brez vonja in okusa. Njihova tvorba in akumulacija predstavlja napredovanje avtooksidacije, ne pomeni pa tudi pojava žarkosti.

Hidroperoksidi so relativno neobstoječi. Ko se njihova koncentracija v sistemu poveča, se pričnejo pretvarjati v druge spojine. Ena od možnih reakcij je monomolekularen razpad hidroperoksidov v alkoksi in hidroksi radikal. Obstajajo različne možnosti nadaljnjih reakcij alkoksi radikalov:

- a.) Tvorba aldehydov. Po tej poti se tvori aldehyd s kratko verigo. Tvori se tudi ekvivalentna količina novih prostih radikalov, ki vstopajo v novo verižno reakcijo. Aldehydi se lahko oksidirajo v kislino, reducirajo alkohol, reagirajo z amino skupino, itd.
- b.) Redukcija do alkohola. V tem primeru reagira alkoksi radikal z novo molekulo maščobe ob tvorbi alkohola in novega prostega radikala, ki sodeluje pri nadaljevanju verižne reakcije.
- c.) Tvorba ketonov. Alkoksi radikal se oksidira z drugim prostim radikalom. To je reakcija terminacije.

Razgradnja hidroperoksidov do alkoksi in hidroksi radikalov je predominantna pot, dokler je obseg oksidacije nizek. Ko oksidacija napreduje, potekajo bimolekularni procesi, kot je polimerizacija. Polimerizacija je tvorba viskoznih, gumi podobnih polimerov, kot posledica avtooksidacije maščob (Zelenik-Blatnik, 1992).

Posledica oksidacije je nastanek neprijetnega vonja in okusa, ki je značilno za žarka olja in maščobe, kakor tudi sprememba funkcionalnih in prehranskih lastnosti olja (Skvarča, 2000).

2.1.2 Maščobe, maščobne kisline in lipidna oksidacija

Maščobe in olja so biološke mešanice rastlinskega izvora, sestavljene iz estrov alkohola glicerola in maščobnih kislin (Dauquan in sod., 2011).

Maščobne kisline so biološke molekule, ki vsebujejo polarno karboksilno skupino, vezano na nerazvejano alifatsko verigo. Število ogljikovih atomov v maščobnih kislinah je lahko 4-36. Ogljikovi atomi so povezani z enojnimi (nasičene maščobne kisline) ali z eno ali več dvojnimi vezmi (nenasičene maščobne kisline) (Boyer, 2005).

Nenasičene maščobne kisline imajo ravno verigo s sodim številom ogljikovih atomov (od C₁₀ do C₂₄), najpomembnejše pa so tiste z 18-C atomi in eno ali več dvojnimi vezmi. Kisline z dvema ali več dvojnimi vezmi, ki so znane kot polinenasičene kisline (linolna, linolenska) in jih uvrščamo v skupino ω -3 in ω -6 maščobnih kislin, so esencialne (Zelenik-Blatnik, 1992). Oleinska kislina je poleg linolne kisline najbolj zastopana maščobna kislina v rastlinskih oljih (Smith in sod., 2007).

Fizikalne in kemijske lastnosti ter stabilnost olj in maščob so odvisne od sestave maščobnih kislin (Kostik in sod., 2013).

Nasičene maščobne kisline so najbolj stabilne in najmanj podvržene oksidaciji. Manj stabilne od nasičenih so nenasičene maščobne kisline. Polinenasičene maščobne kisline so manj stabilne od mononenasičenih maščobnih kislin, ker so zaradi prisotnosti dveh ali več dvojnih vezi bolj občutljive na oksidacijo (Aladedunye in Przybylski, 2013).

Linolna kislina velja za 40-krat reaktivnejša od oleinske kisline, zaradi dveh dvojnih vezi, kjer so vodikovi atomi šibkeje vezani na enajstem ogljikovem atomu. Hitrost avtooksidacije linolenske kisline je 2,4-krat hitrejša od avtooksidacije linolne kisline (Roman in sod., 2013).

Na stabilnost olj in maščob poleg maščobnih kislin vplivajo tudi mikro komponente. Jedilna olja po rafiniranju in deodorizaciji vsebujejo manjše količine komponent prisotnih v manjši koncentraciji, kot so proste maščobne kisline, monoacilgliceroli, diacilgliceroli, fosfolipidi, steroli, tokoferoli, klorofili, karotenoidi, hidroperoksidi, oksidirane komponente in kovinski ioni, ki vplivajo na kvaliteto olj. Nekatere od teh komponent se v oljih lahko obnašajo kot antioksidanti, druge pa kot prooksidanti (Choe, 2008).

Reakcije med vodo in triacilglicerolom povzročijo nastanek prostih maščobnih kislin in diacilglicerola (Chen in sod., 2011). Tudi po rafiniranju in deodorizaciji jedilna olja vsebujejo približno 0,05-0,70 % prostih maščobnih kislin. Proste maščobne kisline so bolj dovzetne za avtooksidacijo kot zaestrene maščobne kisline. Proste maščobne kisline pospešujejo oksidacijo triacilglicerola v rastlinskih oljih in delujejo kot prooksidanti. Proste maščobne kisline delujejo kot prooksidanti ker direktno spodbujajo kislinsko katalizirano razgradnjo lipidnih hidroperoksidov in/ali ker se s kovinskimi ioni povežejo v prooksidantne komplekse (Chen in sod., 2011; Yi in sod., 2013).

Prooksidantna aktivnost prostih maščobnih kislin ni odvisna samo od koncentracije prostih maščobnih kislin, ampak tudi od molekularne strukture oz. sestave maščobnih kislin. Proste maščobne kisline s krajšimi verigami in višjo stopnjo nenasičenosti imajo večji prooksidantni učinek (Yi in sod., 2013). Prooksidantna aktivnost prostih maščobnih kislin je torej odvisna od kvalitete olj in maščobnokislinske sestave olj (Waraho in sod., 2011). Povišanje koncentracij prostih maščobnih kislin v rastlinskih oljih (0,05-1 %) povzroči povišanje izgub tokoferolov (Yoshida in sod., 1992).

Yoshida in sodelavci so leta 1992 so v svoji študiji delali s prostimi maščobnimi kislinami kot so kaprilna, kaprinska, lavrinska, miristinska, palmitinska in stearinska maščobna kislina. Te kisline so dodajali segretemu sojinemu olju. Rezultati so pokazali, da dodatek prostih maščobnih kislin pospešuje oksidacijo. Izkazalo se je, da oksidacijo bolj pospešujejo proste maščobne kisline s krajšimi verigami. Dodatki višjih koncentracij prostih maščobnih kislin so se izkazali za bolj prooksidativne.

Auborg (2001) je naredil študijo, ki je dala podobne rezultate za ribje olje. Višja stopnja oksidacije se je pokazala pri dodatku prostih maščobnih kislin s krajšo verigo (lavrinska in miristinska). Nižja stopnja oksidacije se je pokazala ob dodatku prostih maščobnih kislin z daljšo verigo (stearinska in arahidonska).

Paradiso in sodelavci (2010) so naredili študijo vpliva prostih maščobnih kislin na potek oksidacije v oljčnem olju. Uporabili so prečiščeno mešanico deviškega in rafiniranega oljčnega olja, kateremu so dodali prečiščen hidrolizat te mešanice, ki je vseboval proste maščobne kisline). Olju so dodali hidrolizat v štirih različnih koncentracijah (0,25 %, 0,50 %, 1 % in 3 %). Vzorce so dali za 10 dni na 60 °C. Izkazalo se je, da so se primarni in sekundarni produkti oksidacije najbolj tvorili v olju z dodatkom 0,25 % in 0,5 % MK, nato sta sledili kontrola in dodatek 1 % mešanice MK, medtem ko je bila v olju z dodatkom 3 % mešanice MK vsebnost peroksidov najmanjša v vseh časovnih intervalih. Kljub navidez antioksidativnemu učinku večjih koncentracij MK, pa so vsi dodatki rezultirali v krajših indukcijskih periodah v rancimatnem testu. Razlog temu je najverjetneje to, da imajo karboksilne skupine prostih maščobnih kislin katalitični efekt na razgradnjo hidroperoksidov. Proste maščobne kisline naj bi tako bile pretežno vključene v pospeševanje razgradnje hidroperoksidov, bolj kot pa v njihovo nastajanje (Paradiso in sod., 2010).

Waraho in sodelavci so se leta 2011 lotili študija vpliva dodanih prostih maščobnih kislin na potek lipidne oksidacije v emulziji sojinega olja in vode. Sojino olje so prečistili in pripravili 1 % emulzijo z vodo, ki so jo shranili na 15 °C v temi za več dni. Tej emulziji so nato dodajali naslednje proste maščobne kislin v različnih koncentracijah: oleinska (*cis*), elaidinska (*trans*), linolna (*cis-cis*), lino-elaidinska (*trans-trans*) in linolenska (*cis-cis-cis*). Vzorcem so nato merili primarne produkte oksidacije (hidroperoksidi) in sekundarne produkte oksidacije (heksanal). Rezultati niso pokazali velikih razlik v nastanku hidroperoksidov in heksanala pri dodatku 0,05-0,1 % oleinske kisline oljni emulziji v primerjavi s kontrolnim vzorcem oljne emulzije brez dodatka. Dodatek 0,50 %, 0,75 % in 0,1 % oleinske kisline pa je po dveh dneh inkubacije povzročil bistveno povišanje primarnih in sekundarnih produktov oksidacije, v primerjavi z vzorcem brez dodatka. V emulzijah z dodanimi oleinsko, linolno in linolensko kislino so bile ravni primarnih in sekundarnih produktov lipidne peroksidacije višje v primerjavi z vzorcem brez dodanih prostih maščobnih kislin (ne glede na *cis* ali *trans* konfiguracijo). Zanimivo in v nasprotju z nekaterimi drugimi raziskavami (Yi in sod., 2013) je, da so se koncentracije produktov oksidacije zmanjševale z naraščajočo stopnjo nenasičenosti dodanih prostih maščobnih kislin. V prisotnosti 0,5 % oleinske kisline v emulziji, je nastalo precej več peroksidov in heksanala kot v prisotnosti enakih koncentracij polinenasičenih MK. Možen mehanizem prooksidativnega delovanja prostih maščobnih kislin je, da pospešujejo oksidacijo, ker se najprej oksidirajo same in nato oksidirajo še maščobne kisline, ki so vezane na triacilglicerole v oljih (Waraho in sod., 2011).

2.1.3 Vpliv oksidiranih maščob na zdravje

Oksidirane maščobe vplivajo na razvoj bolezni in potek metabolizma maščob ter povzročajo oksidativni stres in vnetja (Turner in sod., 2006). V človeškem telesu so prosti radikali (eksogeni ali endogeni) ves čas v stalnem ravnotežju z antioksidanti. Ko se ravnotežje poruši, lahko pride do poškodb celičnih struktur, ki so najpogostejši vzrok za staranje in pojav različnih bolezni. Z oksidiranimi maščobami lahko povežemo številne tipe bolezni – aterosklerozo kot predhodnico drugih kardiovaskularnih bolezni, vnetno bolezen sklepov, vključujoč revmatoidni artritis, patogena stanja prebavnega trakta. Prav tako lahko oksidirane maščobe povzročajo mutagenost, genotoksičnost, karcinogenezo in teratogenost (Grootveld in sod., 2001).

Oksidirane maščobe razgrajujejo vitamine B1, B5, B12, E, A, aminokislini metionin in lizin, dražijo črevesno sluznico in znižujejo absorpcijo hrane v črevesju. Razgrajene maščobe imajo kancerogeni učinek, ker malonaldehid in hidroperoksidi katalizirajo nastanek nitrozaminov, ki so potrjeno kancerogeni (Grootveld in sod., 2001).

Metabolizem maščob je pomemben faktor določitve tveganja za nastanek kardiovaskularnih bolezni. Oksidirane maščobe se v človeškem telesu absorbirajo in metabolizirajo, hkrati pa spreminjajo metabolizem holesterola. Večina študij je pokazala da

oksidirane maščobe zvišujejo sprejem holesterola in raven skupnega holesterola. To lahko ima potencialni vpliv na nastanek ateroskleroze. Oksidativni stres ima pomembno vlogo pri razvoju kardiovaskularnih bolezni. Oksidativni stres povzroči povečanje aktivnosti encimov in antioksidantov, vključenih v zmanjševanje oksidativnega stresa. Vnos oksidiranih maščob negativno vpliva na te in druge številne obrambne mehanizme. Številni markerji oksidativnega stresa so pokazali da oksidirane maščobe vplivajo na povišanje markerjev oksidiranosti, zmanjšujejo raven prehranskih antioksidantov (α -tokoferol) v plazmi in spreminjajo antioksidantno aktivnost nekaterih encimov (katalaze in glutathion peroksidaze). Vnetni procesi v organizmu sodeluje pri nastanku ateroskleroze. Oksidirane maščobe imajo v veliki meri pro-vnetne učinke in negativno vplivajo na žilne funkcije pri ljudeh in živalih (Turner in sod., 2006).

2.1.4 Preprečevanje lipidne oksidacije

Lipidno oksidacijo lahko preprečujemo z izključitvijo kisika ali pa z dodatkom antioksidantov. Dodatek antioksidantov je ena izmed učinkovitih metod preprečevanja lipidne oksidacije (Chen in sod., 2011). Antioksidanti so spojine, ki preprečujejo oksidacijo snovi, tako da vežejo proste radikale, kelirajo kovinske ione, in odstranjujejo ali popravljajo oksidativno poškodovane molekule (Korošec, 2000). Kako antioksidanti preprečujejo oksidacijo, je odvisno od vrste antioksidanta. Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski, topni v vodi ali maščobah (Briviba in Sies, 1994).

Antioksidante lahko razdelimo v primarne in sekundarne, odvisno od mehanizma njihovega delovanja.

Primarni antioksidanti so lovilci prostih radikalov, ki delujejo tako, da inhibirajo iniciacijsko stopnjo oksidacije ali prekinajo stopnjo propagacije (Zuta in sod., 2007). Primarni antioksidanti so spojine, ki preprečujejo ali zavirajo proces oksidacije tako, da reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinajo verižno reakcijo avtooksidacije. Tvorbo peroksidnih radikalov ali hidroperoksidov antioksidant onemogoči tako, da odda vodikov atom ali elektron prostemu radikalumu in prekine avtooksidacijo. V to vrsto antioksidantov uvrščamo vitamin C in tokoferole (vitamin E) ter nekatere fenole in njihove derivate (Raspor in sod., 2000).

Sekundarni antioksidanti upočasnijo avtooksidacijo tako, da reagirajo s prostimi kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, razgrajujejo hidroperokside do komponent, ki niso prosti radikali, absorbirajo UV svetlobo in deaktivirajo aktivni kisik. Predstavniki sekundarnih antioksidantov so fenoli, tokoferoli (vitamin E), karotenoidi in nekatere druge naravne spojine (Raspor in sod., 2000).

Antioksidant reagira s peroksidnim radikalom, ki je nastal z oksidacijo lipida. Tvori se hidroperoksidna molekula in prosti radikal antioksidanta.



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

Antioksidanti reagirajo podobno z alkoksidnim prostim radikalom, ki nastane med razgradnjo hidroperoksida.



Najbolj pogosto uporabljeni antioksidanti so lovilci prostih radikalov, ki inaktivirajo proste radikale, ki se tvorijo v iniciacijski in propagacijski stopnji lipidne oksidacije. Številni naravni ali sintetični fenoli lahko reagirajo s hidroperoksidnimi in alkoksilnimi radikali, in tako le-ti ne morejo pospešiti oksidacije nenasičenih maščobnih kislin. Ponavadi imajo sintetični fenolni antioksidanti (kot so BHA, BHT, TBHQ) višjo antioksidativno aktivnost kot pa naravni. Koriščenje sintetičnih fenolnih antioksidantov je omejeno zaradi domnevnega negativnega vpliva na zdravje (Chen in sod., 2011).

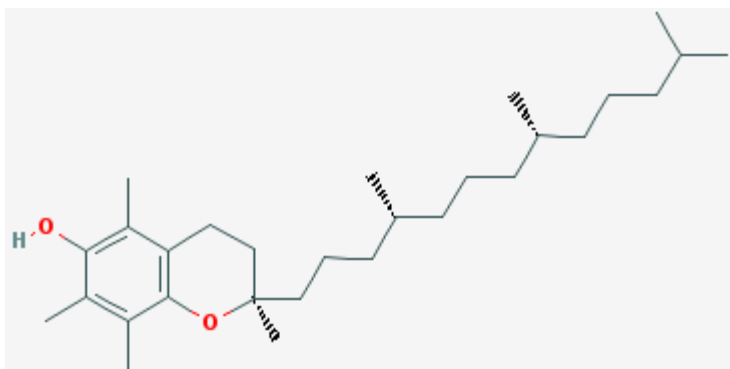
Učinkovitost antioksidantov v maščobah je odvisna od:

- vrste olja in maščob glede na vsebnost nenasičenih maščobnih kislin,
- temperature, ki vpliva na mehanizem oksidacije in razgradnjo hidroperoksidov, primarnih oksidacijskih produktov (hidroperoksidi) ali sekundarnih produktov (karbonilne spojine in/ali hlapne komponente),
- mešanice antioksidantov, pogosto tudi sinergistov,
- topnostnih dejavnikov (porazdelitev antioksidantov med vodno in oljno fazo) (Gunstone, 1996).

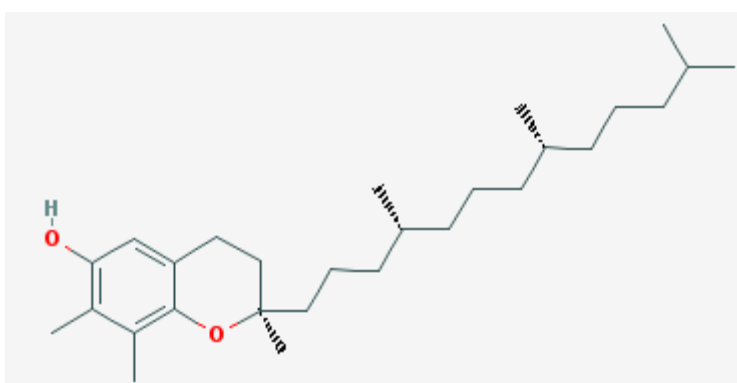
2.2 TOKOFEROLI (VITAMIN E)

Vitamin E obstaja v naravi kot zmes kemijsko med seboj podobnih spojin in so po sestavi fenolne spojine. Razlikujejo se po položaju in številu metilnih skupin na benzenovem obroču (Rudan-Tasič, 2000). V družini tokoferolov poznamo 8 strukturno različnih komponent; 4 komponente poznane kot tokoferoli in 4, poznane kot tokotrienoli. Vse strukture so si med seboj podobne in sestojijo iz 6-kromanolnega aromatskega obroča s hidroksilno skupino in stransko alifatsko verigo s 16-imi ogljikovimi C atomi. Tokotrienoli se od tokoferolov razlikujejo po tem, da imajo tri dvojne vezi (nenasičene vezi) v stranski alifatski verigi. Tokoferoli in trienoli sestojijo iz α -, β -, γ - in δ - izomer. Najpogostejša sta α -tokoferol z molsko maso 430, 7061 g/mol in γ -tokoferol z molsko maso 416, 67952 g/mol, ki sta prikazana na sliki 1 in 2 (Eskin in Przybylski, 2001).

Vse omenjene spojine so biološko aktivne in izkazujejo lastnosti antioksidantov (*in vivo* in *in vitro*), ki ščitijo nenasičene maščobne kisline pred oksidacijo. α -tokoferol je glavna aktivna sestavina vitamina E ter v naravi tudi najbolj razširjena; naravni stereoizomer je RRR- α -tokoferol (R konfiguracija na vseh treh asimetričnih C atomih v stranski verigi), sintetično pridobljeni α -tokoferol (manj biološko aktiven) pa je zmes različnih možnih stereoizomer, zato oznaka all-*rac*- α -tokoferol (Rudan-Tasič, 2000).



Slika 1: Strukturna formula α -tokoferola (NCBI, 2015a).



Slika 2: Strukturna formula γ -tokoferola (NCBI, 2015b).

Med naravnimi antioksidanti so tokoferoli najbolj pogosti lovilci prostih radikalov, ki jih najdemo v rastlinskih oljih, hkrati pa so najverjetneje najpomembnejši antioksidanti v rastlinskih oljih. Tokoferoli spadajo med naravno prisotne spojine, ki jih najdemo v rastlinah. Nepredelana rastlinska olja normalno vsebujejo koncentracije tokoferolov med 200 in 1000 ppm ($\approx 0,5$ - $2,5$ mmol/L). Po rafiniranju, približno 70 % naravno prisotnih tokoferolov ostane v olju. Približno 30 % tokoferolov je v oljih odstranjenih po postopku deodorizacije (Zuta in sod., 2007). Vsebnost tokoferolov v nekaterih oljih in masteh je predstavljena v Preglednici 1.

Preglednica 1: Vsebnost skupnih tokoferolov v nekaterih oljih in masteh (mg/kg) (Gunstone, 1996)

OLJE	Tokoferoli				Tokotrienoli	
	α	β	γ	δ	α	β
Repično	210	1	42	/	/	/
Koruzno	112	50	602	19	/	/
Bombažovo	389	/	387	/	/	/
Oljčno	119	/	7	/	/	/
Palmovo	256	/	316	70	146	3
Arašidovo	130	/	214	21	/	/
Sezamovo	136	/	290	/	/	/
Sojino	75	15	797	266	2	/
Sončnično	487	/	51	8	/	/
Iz pšeničnih kalčkov	1330	710	260	271	26	18
Orehovo	563	/	595	450	/	/
Slanik	92	/	/	/	/	/
Svinjska mast	12	/	7	/	7	/
Loj	27	/	/	/	/	/

(vrednost pod 1 ppm je prikazana s /)

Najbogatejši viri vitamina E so rastlinska olja, sojina moka, koruza, bombažno seme, žitni kalčki, orehi, lešniki, nekoliko manj pa ga je v zelenolistni zelenjavi ter ribah in sadju. Kot celični antioksidant je vitamin E (α -tokoferol) nujno potreben za žive organizme, saj preprečuje spontano oksidacijo močno nenasičenih spojin, predvsem tvorbo peroksidov v nenasičenih maščobnih kislinah v lipidnih membranah ter ščiti druge biološko aktivne spojine, npr. vitamin A, ubikinon, hormone in encime pred oksidacijo. Biološko (vitaminsko) ter antioksidativno delovanje tokoferolov je odvisno od strukture in se spreminja takole:

- biološko delovanje (aktivnost vitamina E): $\alpha \gg \beta, \gamma, \delta$,
- antioksidativno delovanje $\delta \gg \beta > \gamma > \alpha$.

V živilski industriji ima dodajanje α -tokoferola in mešanih tokoferolov različnim živilom bolj kot samo povečanje vsebnosti vitamina E (izboljšava hranilne vrednosti živil), predvsem namen povečati obstojnost živil (Rudan-Tasič, 2000).

Tokoferoli so med najbolj učinkoviti naravni lipidni antioksidanti. Lipidni radikali z njimi reagirajo veliko hitreje kot z ostalimi molekulami v oljih in maščobah; ena molekula tokoferola lahko varuje približno 10^3 do 10^8 molekul polinenasičenih maščobnih kislin pri majhnih peroksidnih vrednostih (Eskin in Przybylski, 2001).

Antioksidativno delovanje tokoferolov sloni na dveh principih: na principu elektron donorske prekinitve avtooksidacijske verige in na principu elektron akceptorske prekinitve avtooksidacijske verige (Zuta in sod., 2007).

Mehanizem delovanja tokoferolov kot antioksidantov:

Antioksidativna aktivnost tokoferolov večinoma temelji na njihovi sposobnosti doniranja vodikovega atoma prostim maščobnim radikalom.



(Zuta in sod., 2007).

Tekom oksidativnih sprememb maščob lahko tokoferoli v različnih reakcijah tvorijo fenoksilne radikale, ki so resonančno stabilizirani (nizko energetski intermediati) in kot taki zaključijo verižno radikalsko reakcijo do stabilnih spojin.



(Kahl in Hildebrandt, 1986).

Najpomembnejša je prva reakcija in med tokoferoli najhitreje reagira α -tokoferol, celo hitreje kot npr. sintetični antioksidant BHT (Rudan-Tasič, 2000). α -tokoferol je zaradi svoje strukture bolj učinkovit donor vodikovih atomov kot ostale izomere (Eskin in Przybylski, 2001).

Antioksidativno delovanje tokoferolov je pri nižjih temperaturah (20 do 60 °C) bolj učinkovito pri α -tokoferolu, temu sledijo β -, γ - in δ -tokoferol; pri višjih temperaturah (80 do 120 °C) je zaporedje po učinkovitosti naslednje: $\delta < \gamma < \beta < \alpha$ (Eskin in Przybylski, 2001).

Večji učinek γ - ali tudi npr. δ -tokoferola kot antioksidanta, v primerjavi z α -tokoferolom, temelji na večji stabilnosti γ - in δ -tokoferola tudi pri višjih temperaturah ter različnih produktih v procesu antioksidativnega delovanja. V primeru γ -tokoferola se kromanski obroč ne odpre, nastala dimerna produkta sta še vedno antioksidativno aktivna za razliko od produkta, ki nastane v primeru α -tokoferola, to je *p*-kinona (Rudan-Tasič, 2000).

Pod določenimi pogoji je antioksidativna sposobnost α - tokoferolov manj učinkovita, kadar gre za zvišanje koncentracije samih tokoferolov. To se zgodi zaradi njihove sposobnosti redukcije oksidiranih oblik kovinskih ionov prehodnih elementov (Cu^{2+} , Fe^{3+}) endogenih prehodnih kovin, ki so naravno prisotne v oljih ali pa se pojavijo zaradi kontaminacije med procesiranjem. Te reducirane kovine lahko pospešujejo razgradnjo že obstoječih lipidnih hidroperoksidov.





Zmanjšana aktivnost tokoferolov je posledica sposobnosti tokoferilnih radikalov, da pospešujejo oksidacijo maščobnih kislin, posebno kadar so koncentracije tokoferilnih radikalov visoke (Zuta in sod., 2007). Sprememba aktivnosti v prooksidativno delovanje se opazi, če se poveča koncentracija α -tokoferola od 0,04 na 4 % (izraženo na maso linolne kisline), dočim γ - in δ - tokoferol izkazujeta antioksidativno sposobnost tudi pri višji koncentraciji (Rudan-Tasič, 2000).

Aktivnost tokoferolov kot prooksidantov je lahko odvisna tudi od temperature in strukture medija ali okolja, v katerem se nahajajo (Zuta in sod., 2007).



Možno je, da se oksidirani tokoferoli naravno pojavljajo v olju, kar predstavlja vir prooksidantov (Chen in sod., 2011; Zuta in sod., 2007).

Več študij je pokazalo, da naj bi bili tokoferoli učinkovitejši v animalnih maščobah, kot v rastlinskih maščobah. Pokazalo se je tudi, da naj bi bili tokoferoli bolj stabilni v oljih z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (Zuta in sod., 2007).

Tokoferoli se pogosto dodajajo živilom v kombinaciji z drugimi antioksidanti in sinergisti (Rudan-Tasič, 2000).

2.3 BAZE KOT ANTIOKSIDANTI

Za zaščito maščob pred oksidacijskimi procesi poznamo več metod. Med najbolj pogostimi in učinkovitejšimi je dodajanje antioksidantov, naravnih in sintetičnih. Uporaba sintetičnih antioksidantov je omejena zaradi potencialnih nevarnih učinkov za zdravje. Kljub vsemu pa se v zadnjem času večja interes po razvoju novih antioksidantov, ki bi bili čim manj toksični, ki bi imeli visoko antioksidativno delovanje, bi bili dobro termično stabilni in ki bi bili pripravljani/proizvedeni iz naravnih prekurzorjev (Aladedunye in sod., 2012).

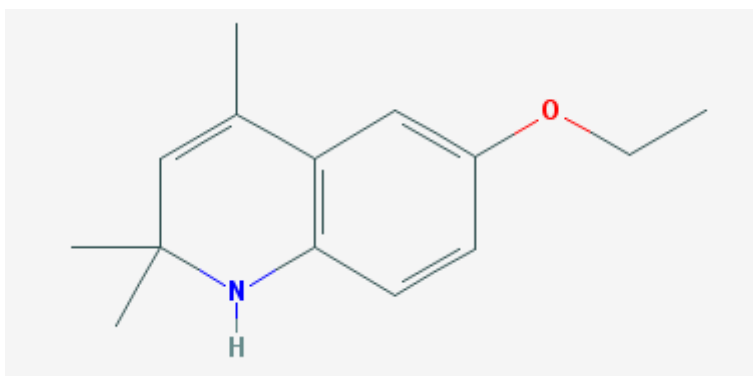
Med potencialne naravne antioksidante bi lahko spadali amini. Amini so organske spojine s funkcionalno skupino, ki vsebuje dušikov atom s parom neveznih elektronov. Amini se obnašajo kot šibke baze. Tisti z manjšo molekulsko maso, ki so bolj hlapni, imajo običajno močan vonj po pokvarjenih ribah ali gnijočem živalskem mesu. Amini kot baze so donorji elektronskega para (Atkins in sod., 1998).

Amini so derivati amoniaka, v katerem je eden ali več vodikovih atomov zamenjanih, na primer z alkilnimi ali arilnimi skupinami. Glede na število alkilnih skupin, vezanih na dušik, jih delimo na primarne, sekundarne in terciarne amine. Primarni amini so močnejše

baze kot amoniak, sekundarni amini so še nekoliko močnejši. Terciani amini pa so po navadi šibkejši kot primarni (Atkins in sod., 1998).

Nekateri amini (npr. etoksikvin) se že dolgo uporabljajo kot antioksidanti v lipidnih sistemih.

Etoksikvin (prikazan na sliki 3) je amin in se kot učinkovit antioksidant uporablja v živalski prehrani, saj varuje maščobe pred lipidno peroksidacijo in stabilizira maščobotopne vitamine (vit. A in E).



Slika 3: Strukturna formula etoksikvina (NCBI, 2015c).

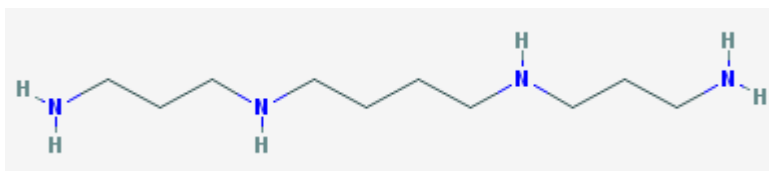
Etoksikvin se uporablja kot antioksidant v konzervirani hrani za male živali in v krmi, namenjeni ribam in perutnini. Dovoljena količina etoksikvina v prehrani za živali znaša 150 ppm.

Uporaba etoksikvina ni dovoljena v hrani namenjeni ljudem. Dovoljen je le za ohranjanje barve paprike in čilija v prahu, prav tako je dovoljen kot dodatek, ki preprečuje porjavenje pri jabolkih in hruškah (inhibira nastajanje rjavih madežev na plodovih). Ker se etoksikvin uporablja kot antioksidant v prehrani živali, ga lahko najdemo tudi v drugih produktih namenjenih človeški prehrani, npr. v ribah, ribjem olju, drugih oljih, maščobah in mesu. Dovoljen dnevni vnos etoksikvina za človeka je 0-0,005 mg/kg telesne teže (Blaszczyk in sod., 2013).

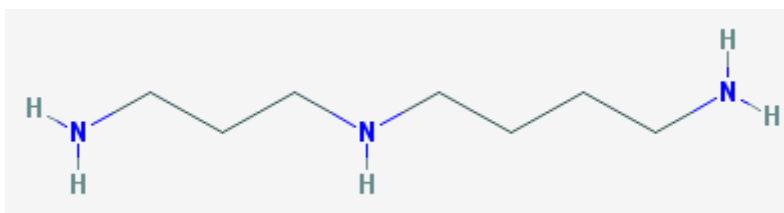
Etoksikvin deluje kot lovilec prostih radikalov. Ob prisotnosti visokih koncentracij kisika reagira z alkil-peroksilnim radikalom in se pri tem sam pretvori v radikalsko obliko. Ta lahko vstopa v različne poti in se stabilizira z izgubo metilne skupine ali aromatizacijo obroča (Taimr, 1994).

Na temo delovanja aminov kot antioksidantov je bilo narejenih več študij. Toro-Funes in sodelavci (2013), so se osredotočili na dva poliamina, spermin (SPM) in spermidin (SPD). Ta poliamina sta naravno prisotna v rastlinski in živalski hrani. Poliamini so alifatske molekule z najmanj dvema amino skupinama. SPM in SPD (prikazana na slikah 4 in 5) imata zmožnost, da delujeta kot antioksidanta v bioloških sistemih. Raziskovalci so v tej študiji uporabili sojino olje z visoko vsebnostjo nenasičenih maščobnih kislin. Dodali so

mu SPM, SPD in ostale antioksidante: α -tokoferol, palmitoil-L-askorbinsko kislino, askorbinsko kislino in oktil-galat (vse v treh različnih koncentracijah-50, 100 in 150 $\mu\text{g/mL}$, na 50 °C, v temi, izpostavljeno kisiku, 31 dni). Rezultati merjenja peroksidnega števila so pokazali odlično delovanje SPM in SPD pri upočasnitvi procesa peroksidacije. Tudi ostali antioksidanti so upočasnili peroksidacijo, vendar je bil ves čas inkubacije SPM najučinkovitejši. SPM se je izkazal za učinkovitejšega kot SPD. Med vsemi antioksidanti poleg oktil-galata, sta samo poliamina upočasnila nastanek sekundarnih komponent oksidacije (konjugiranih trienov in karbonilov) (Toro-Funes in sod., 2012). Morda sta se poliamina izkazala kot učinkovitejša antioksidanta zato, ker ostali uporabljeni antioksidanti delujejo samo kot lovilci prostih radikalov, SPM in SPD pa zaradi dušikovih skupin tudi kot kelatorja kovinskih ionov (Das in Misra, 2004). Raziskovalci domnevajo, da se je SPM izkazal za učinkovitejšega kot SPD, zaradi večjega števila amino skupin (Toro-Funes in sod., 2012).



Slika 4: Strukturna formula spermina (NCBI, 2015č).



Slika 5: Strukturna formula spermidina (NCBI, 2015d).

Leta 1992 sta Yen in Kao naredila študijo delovanja biogenih aminov na potek oksidacijskih procesov v linolni kislini. Biogeni amini so prisotni v naši hrani, nekateri izmed njih, npr. putrescin, kadavrin, spermidin in ostali so poznani kot lovilci radikalov in inhibitorji oksidacijskih procesov. Yen in Kao sta v študijo vključila 2-feniletilamin, triptamin in tiramin (vsi prisotni v naši prehrani) in ostale antioksidante: α -tokoferol, BHA, BHT, propil-galat in TBHQ v različnih koncentracijah, raztopljenih v etanolu (100 μL raztopine na 0,13 mL linolne kisline, raztopljene v etanolu, na 40 °C, v temi, 24 dni). Rezultati so pokazali, da imajo ti amini inhibitorni učinek na tvorbo hidroperoksidov. Najučinkovitejši je bil tiramin. V primerjavi z neaminskimi antioksidanti pa je bil tiramin šibkejši antioksidant.

Večina naravnih antioksidantov ima v svoji strukturi fenolno hidroksilno skupino. Ti delujejo tako, da donirajo svoj elektron ali vodikov atom. Poliamini delujejo kot lovilci radikalov zaradi svoje amino skupine. Tiramin ima amino in hidroksilno skupino, zato lahko deluje kot antioksidant (Yen in Kao, 1992).

Chien in sodelavci so leta 2004 naredili študijo vpliva stearylamina na potek oksidacije holesterola. Mehanizem oksidacije holesterola je podoben mehanizmu oksidacije lipidov (veržna reakcija); rezultat je tvorba oksidiranih produktov holesterola in molekul, ki nastanejo s pretvorbami le-teh.

Chien in sod. (2004) so 100 mg standarda holesterola dodali 70 mg stearylamina (segrevanje 2 minuti, 140 °C, prisotnost kisika). Uporabili so metodo HPLC, ki je podala rezultate o pretvorbi holesterola ter o prisotnosti in količini oksidiranih produktov holesterola. Rezultati so pokazali, da je izguba holesterola v prisotnosti stearylamina počasnejša, kot v odsotnosti stearylamina (spremljanje izgube 120 minut). Kromatografska analiza je pokazala, da so se oksidirani produkti holesterola v odsotnosti stearylamina močno povišali že po 40-ih minutah, v prisotnosti stearylamina pa so se le rahlo povišali po 2 urah.

Kljub nejasnosti o mehanizmu delovanja stearylamina več raziskovalcev (Alaiz in Barragan, 1995; Alaiz in sod., 1996) meni, da so primarni in sekundarni amini sposobni reagirati z oksidiranimi lipidi in tvoriti lipidno-aminske produkte, ki omogočajo zaščito pred lipidno oksidacijo. Nekateri amini lahko reagirajo z alkenali in epoksialkenali in tako tvorijo komponente z antioksidativnim delovanjem.

Aladedunye in sod. (2011) so iz heksilamina in nekaterih fenolnih kislin sintetizirali amide ter analizirali njihovo antioksidativno delovanje v oljih. Test je potekal tako, da so sintetiziranemu produktu dodali olje oljne repice. Olje so testirali pod različnimi skladiščnimi pogoji in po cvrenju. Novi antioksidanti so se pokazali kot dobri lovilec prostih radikalov, nove komponente so prav tako upočasnile oksidacijo polinenasičenih maščobnih kislin. Poleg antioksidativne aktivnosti so se izkazali kot dobro termično stabilni. Antioksidativno učinkovitost so pripisali amino skupini, ki deluje kot lovilec prostih radikalov.

2.3.1 Heksilamin in triheksilamin

V znanstveni in strokovni literaturi je na voljo relativno malo podatkov o heksilaminu in triheksilaminu.

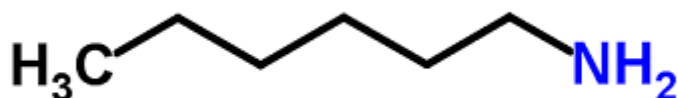
Heksilamin (prikazan na sliki 6) je amin, s kemijsko formulo $C_6H_{15}N$ in molsko maso 101,19 g/mol, ki ima na koncu alkilne verige s šestimi C atomi primarno amino skupino. Gre za brezbarvno do rumenkasto obarvano tekočino z značilno aromo po ribah. Dobro je topen v alkoholih in večini ostalih organskih topil. Topen je tudi v vodi. Temperatura tališča je -23,4 °C in temperatura vrelišča 131,5 °C (FAO, 2014).

Heksilamin je šibka baza. Logaritem asociacijske konstante za protonacijo baze (pK_b) v vodi je 3,44 (pK_a je 10,56) (Dissociation constants of organic acids and bases, 2015).

Heksilamin se uporablja kot izhodna surovina v proizvodnji površinsko aktivnih snovi, pesticidov, barvil, gume, emulgatorjev, zdravil ter kot zaviralec korozijskih procesov.

Za heksilamin je v toksikoloških podatkih proizvajalca kemikalije znan podatek o srednjem smrtnem (smrtonosnem) odmerku ali srednji letalni dozi LD_{50} (najbolj uporabljan indikator smrtnosti). To je odmerek, ki pri polovici poskusnih živali povzroči smrt oz. ocenjeni odmerek, ki bi pri približno polovici prizadetih oseb povzročil smrt. Za heksilamin znaša LD_{50} za podgane 240 mg/kg (Merck Millipore, 2015).

Heksilamin se uporablja kot živilski aditiv in sicer kot aroma. Nima svoje E številke, vendar je registriran v bazi EAFUS (Everything Added to Food in the United States) na spletni strani Uprave ZDA za hrano in zdravila - FDA (U. S. Food and Drug Administration) (FDA, 2014). Na spletni strani Urada Združenih držav za patente in blagovne znamke - USPTO (United States Patent and Trademark Office) je heksilamin omenjen kot ena izmed komponent, ki tvori uradno patentirano aromo dima kot dodatek mesnim izdelkom (USPTO, 2014). Svetovna zdravstvena organizacija – WHO (World Health Organization) je v svojem 69. poročilu ovrednotila nekatere komponente, ki se uporabljajo kot arome, med drugim tudi heksilamin. V zaključku je podano mnenje, da pri heksilaminu ni skrbi glede varnosti. Podan je tudi vnos za človeka: v EU 0,02 $\mu\text{g}/\text{dan}$ in 0,0004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne teže/dan. Za ZDA ni tega podatka (WHO, 2009).

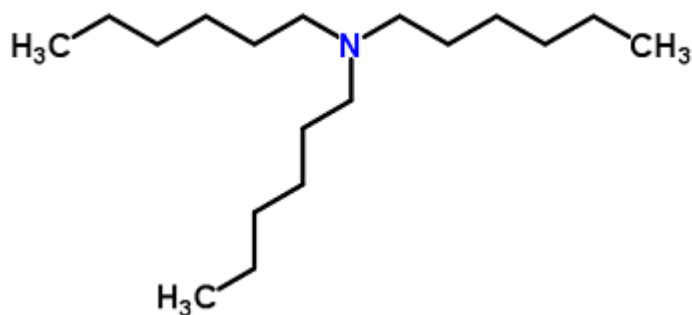


Slika 6: Strukturna formula heksilamina (RSC, 2015a).

Triheksilamin (prikazan na sliki 7) je terciarni amin s kemijsko formulo $C_{18}H_{39}N$ in molsko maso 269,51 g/mol. Gre za rahlo rumenkasto obarvano tekočino, ki ima vonj po ribah. Gostota triheksilamina je 0,794 g/cm^3 . Spojina ima vrelišče v območju od 263-265 $^{\circ}\text{C}$.

Logaritem asociacijske konstante za protonacijo baze v vodi je 3,54 (pK_a je 10,46) (Larsson in sod., 2011).

Za triheksilamin je v toksikoloških podatkih proizvajalca kemikalije znan podatek o srednjem smrtnem (smrtonosnem) odmerku ali srednji letalni dozi LD_{50} . Za triheksilamin znaša LD_{50} za podgane 1200 mg/kg (Pfaltz&Bauer, 2015). Potencialni negativni učinki na zdravje naj bi bili povezani predvsem z bazičnostjo triheksilamina, saj pri visokih koncentracijah draži sluznico.



Slika 7: Strukturna formula triheksilamina (RSC, 2015b).

2.4 KARAKTERISTIKE NEKATERIH OLJ

Maščobnokislinska sestava olj je odvisna od genetskih in okoljskih faktorjev. Povprečna energetska vrednost rastlinskih olj je 3780 kJ ali 900 kcal/100 g

2.4.1 Rafinirano oljčno olje

Oljčno olje je pridobljeno iz plodov oljke (*Olea europaea* L.).

V oljčnem olju prevladujejo mononenasičene maščobne kisline, sledijo jim nasičene maščobne kisline. Oljčno olje vsebuje malo nasičenih maščobnih kislin, med temi kislinami prevladuje palmitinska kislina. Med mononesičenimi maščobnimi kislinami prevladuje oleinska maščobna kislina, ki predstavlja skoraj 80 % vseh maščobnih kislin. Med večkrat nenasičenimi maščobnimi je največ linolne kisline. Oljčno olje ima ugodno maščobnokislinsko sestavo zaradi visokega deleža mononesičenih maščobnih kislin. Oljčno olje vsebuje od 100-300 mg tokoferolov/kg olja, med katerimi prevladujejo α -tokoferoli, ostalih tokoferolov vsebuje zelo malo (Boskou, 2002). Oljčno olje ni zelo podvrženo lipidni oksidaciji zaradi nizke vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin in prisotnosti naravnih antioksidantov (α -tokoferol) in fenolnih komponent (Morales in Przybylski, 2000).

2.4.2 Rafinirano sončnično olje

Sončnično olje je pridobljeno iz sončničnih semen (*Helianthus annuus* L.).

Sončnično olje vsebuje visoke koncentracije linolne kisline, sledi oleinska kislina. Vsebuje malo nasičenih maščobnih kislin in le manjše količine palmitinske in arahidonske kisline. Najpomembnejši antioksidant v sončničnem olju je α -tokoferol, ki ga vsebuje okoli 600 ppm ter ostali tokoferoli in tokotrienoli (Gupta, 2002). Zaradi visoke vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin, je olje odličen vir esencialnih maščobnih kislin v človeški prehrani, čeprav je zaradi majhne vsebnosti linolenske kisline razmerje med omega-6 in omega-3 maščobnimi kislinami relativno neugodno (Salunkhe in sod., 1992). Sončnično olje je zaradi visoke vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin podvrženo oksidacijskim procesom (Gupta, 2002).

2.4.3 Rafinirano koruzno olje

Koruzno olje je pridobljeno iz koruznih kalčkov (*Zea mays* L.)

Približno četrtnino vseh maščobnih kislin v koruznem olju predstavljajo nasičene maščobne kisline. Med nasičenimi maščobnimi kislinami prevladuje palmitinska kislina. Koruzno olje vsebuje veliko polinenasičenih maščobnih kislin, med katerimi prevladuje linolna kislina. Za koruzno olje velja podobno kot za sončnično, saj je zaradi majhne vsebnosti linolenske kisline razmerje med ω -6 in ω -3 maščobnimi kislinami relativno neugodno.

Ker koruzno olje vsebuje zelo malo linolenske maščobne kisline (manj kot 1 %), ni zelo podvrženo hidrolitičnim in oksidativnim spremembam. Koruzno olje je primerno za toplotno obdelavo, saj je stabilno in brez izrazite arome. Koruzno olje je bogato s tokoferoli in jih vsebuje do 1000 ppm, predvsem α -tokoferole in γ -tokoferole. Visoka vsebnost aktivnih antioksidantov je pomembna zaradi oksidativne stabilnosti koruznega olja (Salunkhe in sod., 1992).

2.4.4 Laneno olje

Laneno olje je pridobljeno iz lanenih semen (*Linum usitatissimum* L.)

Laneno olje ne vsebuje veliko nasičenih maščobnih kislin in ima zelo ugodno maščobnokislinsko sestavo, saj vsebuje visok odstotek polinenasičenih maščobnih kislin. Med temi prevladuje esencialna linolenska kislina, sledi ji linolna kislina. Laneno olje vsebuje visoke koncentracije linolenske kisline (omega-3), ki ima pomembno vlogo v več bioloških funkcijah. Zaradi visokih vsebnosti polinenasičenih maščobnih kislin, je laneno olje močno podvrženo lipidni oksidaciji. Laneno olje vsebuje 440-588 mg tokoferolov/kg olja, med katerimi vsebuje največ γ -tokoferola (Kochhar, 2002).

V spodnjih preglednicah (Preglednica 2, 3 in 4) so zbrani podatki študije o maščobnokislinski sestavi zgoraj opisanih olj.

V Preglednici 5 so zbrani podatki študije o vsebnosti tokoferolov zgoraj opisanih olj. Podatki so primerljivi s tistimi o vsebnosti tokoferolov iz Preglednice 1.

Preglednica 2: Vsebnost (v %) nasičenih maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (Kostik in sod., 2013)

OLJE	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0
Oljčno	/	/	/	0,65 ± 0,2	11,5 ± 4	2 ± 0,5	0,22±0,12
Sončnično	/	/	/	/	3,7 ± 1,5	2 ± 0,8	2,3±1,2
Koruzno	4 ± 0,8	7 ± 1,2	/	0,6 ± 0,4	10 ± 0,2	3,5 ± 1,5	/
Laneno	/	/	/	/	5,5 ± 1,5	3,5 ± 1,2	0,65±0,3

Preglednica 3: Vsebnost (v %) nenasičenih maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (Kostik in sod., 2013)

OLJE	C18:1	C18:2	C18:3
Oljčno	78,4 ± 4,3	7,0 ± 3,3	/
Sončnično	31,5 ± 4,5	59,5 ± 7,5	/
Koruzno	26,8 ± 1,2	48 ± 4,5	/
Laneno	22,1 ± 1,5	20,5 ± 1,5	47,5 ± 5,6

Preglednica 4: Vsebnost (v %) skupnih nasičenih maščobnih kislin (NMK), mononenasičenih maščobnih kislin (MNMK), polinenasičenih maščobnih kislin (PNMK) in vrednosti indeksa nasičenih/nenasičenih maščobnih kislin v nekaterih rastlinskih oljih (Kostik in sod., 2013)

OLJE	NMK (%)	MNMK (%)	PNMK (%)	Indeks nasičene/nenasičene MK
Oljčno	14,35 ± 1,9	78,4 ± 4,3	7,0 ± 3,3	0,49
Sončnično	8,8 ± 0,8	31,5 ± 4,5	59,5 ± 7,5	6,76
Koruzno	25,1 ± 1,8	26,8 ± 1,2	48 ± 4,5	1,91
Laneno	9,65 ± 1,05	22,1 ± 1,5	68 ± 2,9	7,05

Preglednica 5: Vsebnost tokoferolov (v mg/100g) v nekaterih rastlinskih oljih (Schwartz in sod., 2008)

OLJE	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Oljčno	17	0,27	0,89	sledovi
Sončnično	59	2,4	1,4	0,27
Koruzno	18	1,1	44	2,2
Laneno	1,2	sledovi	52	0,95

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Osnovni vzorci olj in modelnih lipidnih sistemov

Uporabljeni osnovni vzorci olj in modelnih lipidnih sistemov:

- Rafinirano oljčno olje
Uporabili smo 6 stekleničk rafiniranega oljčnega olja, kupljenega v lekarni. Olje iz vseh šestih stekleničk smo prelili v večjo embalažo in ga homogeno zmešali.
- Laneno olje
Uporabili smo laneno olje znamke Gea.
- Rafinirano sončnično olje
Uporabili smo rafinirano sončnično olje znamke Cekin.
- Koruzno olje
Uporabili smo koruzno olje znamke Cekin.
- Modelni lipidni sistem (metil-linoleat, gliceril trioktanoat-GTO)

3.1.2 Dodatki

Uporabljeni dodatki:

- Heksilamin (HA),
- Triheksilamin (THA),
- Palmitinska kislina (PK),
- α -tokoferol (α -T),
- γ -tokoferol (γ -T).

3.1.3 Kemikalije, laboratorijska oprema in pribor

Uporabljene kemijske spojine za analizo olj:

- 1-propanol,
- 2-propanol,
- barvilo ksilenol oranžno,
- železov (II) sulfat heptahidrat,
- p-anizidin,
- ledocetna kislina,
- mQ voda,
- žveplova (VI) kislina (H_2SO_4),
- terciarni butilhidroperoksid (tBuOOH),
- heksanal,
- 2-butenal (krotonal),
- 2,4-heksadienal,
- tetraoksi propan (TEP).

Aparature:

- analitska tehtnica (Mettler),
- pečica s termostatom (Kambič),
- hladilnik z zamrzovalnikom,
- zamrzovalna skrinja (-80 °C),
- vrtinčnik,
- UV-Vis spektrofotometer (šifra instrumenta?).

Ostala laboratorijska oprema:

- Avtomatske pipete,
- polistirenske kivete,
- polipropilenske kivete,
- kvarčne kivete,
- plastične centrifugirke (15 mL in 50 mL),
- laboratorijska steklovina,
- plastične epice - mikrocentrifugirke (1,5 mL in 2 mL),
- kapalka,
- spatula,
- čolniček za tehtanje,
- alu folija,
- zaščitne rokavice.

3.2 METODE**3.2.1 Priprava vzorcev in modelnih lipidnih sistemov**

Potek oksidacije lipidov smo analizirali v različnih oljih in modelnih lipidnih sistemih. Uporabili smo laneno, sončnično, rafinirano oljčno in koruzno olje ter mešanice lanenega in rafiniranega oljčnega olja. Modelni lipidni sistem smo pripravili iz metil-linoleata, sintetičnega triacilglicerola (TAG), gliceril trioktanoata (GTO), α -tokoferola in γ -tokoferola.

Oljem in modelnim lipidnim sistemom smo dodajali različne koncentracije kislin (palmitinska kislina) in baz (heksilamin, triheksilamin). Kot amin smo dodali tudi kofein, vendar zaradi slabe topnosti le-tega poizkus ni uspel.

Izvedli smo šest enotedenskih poskusov z različnimi olji ter modelnimi lipidnimi sistemi.

3.2.1.1 Poskus 1: Oksidacija lipidov – mešanica rafiniranega oljčnega olja in lanenega olja

Pripravili smo dve mešanici olj. Prva mešanica je vsebovala 10 % lanenega olja in 90 % oljčnega olja, druga mešanica pa 50 % lanenega in 50 % oljčnega olja.

Za vsako mešanico olj smo pripravili raztopine z različnimi dodatki. V 50 mL plastičnih centrifugirkah smo pripravili modelna olja, ki so vsebovala 1 % (≈ 39 mmol/kg olja), 0,3 % (≈ 12 mmol/kg olja), 0,1 % ($\approx 3,9$ mmol/kg olja) PK ter modelna olja, ki so vsebovala 1 % (≈ 37 mmol/kg olja), 0,3 % (≈ 11 mmol/kg olja), 0,1 % ($\approx 3,7$ mmol/kg olja) THA. Kot kontrolo smo uporabili olje brez dodatka kisline ali baze. Skupno smo pripravili 14 vzorcev.

Po 200 mg tako pripravljenih vzorcev smo zatehtali v 50 mL plastične centrifugirke, ki smo jih zaprli. Vsak vzorec smo zatehtali v 5 centrifugirk (4 časovne točke +1 rezerva). Vzorce za dan 0 smo zamrznili v skrinji na -80 °C. Ostale vzorce smo podvrgli razmeram pospešene oksidacije v temi in jih dali v termostatisirano pečico na 60 °C. Posamezne centrifugirke smo odvzeli iz termostatisirane pečice po 24 urah (1 dan), 96 urah (4 dnevi) ter 168 urah (7 dni) od začetka inkubacije. Vse vzorce do analize smo shranili na -80 °C.

3.2.1.2 Poskus 2: Oksidacija lipidov – laneno olje in rafinirano sončnično olje

V 50 mL plastičnih centrifugirkah smo pripravili modelna olja (laneno in rafinirano sončnično) z naslednjimi vsebnostmi HA in THA: 16 mmol/kg olja, 4 mmol/kg olja in 1 mmol/kg olja. Kot kontrolo smo uporabili olja brez dodatka HA in THA. Skupno smo pripravili 14 vzorcev.

Po 200 mg tako pripravljenih vzorcev smo zatehtali v 50 mL plastične centrifugirke, ki smo jih zaprli. Vsak vzorec smo zatehtali v 6 centrifugirk (5 časovnih točk + 1 rezerva). Vzorce za dan 0 smo zamrznili v skrinji na -80 °C. Ostale vzorce smo podvrgli razmeram pospešene oksidacije v temi in jih dali v termostatisirano pečico na 60 °C. Posamezne centrifugirke smo odvzeli iz termostatisirane pečice po 24 urah (1 dan), 72 urah (3 dnevi), 120 urah (5 dni) ter 168 urah (7 dni) od začetka inkubacije. Vse vzorce do analize smo shranili na -80 °C.

3.2.1.3 Poskus 3: Oksidacija lipidov – rafinirano sončnično olje

V 50 mL plastičnih centrifugirkah smo pripravili modelna sončnična olja z naslednjimi vsebnostmi HA: 32 mmol/kg olja, 8 mmol/kg olja in 2 mmol/kg olja; ter olje z dodatkom γ -T (2 mmol/kg). Kot kontrolo smo uporabili olje brez dodatkov. Skupno smo pripravili 5 vzorcev.

Pri pripravi vzorcev, staranju in vzorčenju v ustreznih časovnih intervalih smo postopali na enak način kot je opisano pri točki 3.2.1.2.

3.2.1.4 Poskus 4: Oksidacija lipidov – rafinirano koruzno olje

Pri tem poskusu smo postopali popolnoma enako kot je opisano pod točko 3.2.1.2. Edina razlika je, da smo uporabili rafinirano koruzno olje in ne laneno, oziroma sončnično.

3.2.1.5 Poskus 5: Oksidacija lipidov – modelni lipidni sistem 1 (MLS 1)

Pripravili smo 6 mikrocentrifugirk (Preglednica 6), ki so vsebovale po 200 mg ustrezne mešanice metil-linoleata, GTO in modelnih antioksidantov. Po 40 mg vzorcev smo prenesli v 15 mL polipropilenske centrifugirke. Eno centrifugirko od vsake mešanice (dan 0) smo takoj zamrznili v skrinji na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostale vzorce smo podvrgli razmeram pospešene oksidacije v temi in jih dali v termostatirano pečico na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posamezne centrifugirke smo odvzeli iz termostatirane pečice po 24 urah (1 dan), 72 urah (3 dnevi) ter 120 urah (5 dni) od začetka inkubacije. Vse vzorce do analize smo shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica 6: Eksperimentalni načrt za sestavo vzorcev modelnega lipidnega sistema (MLS1)

Dodatek Vzorec	Metil- linoleat (mg)	GTO (mg)	α -T s konc. 0,55 mmol/kg TAG (mg)	THA s konc. 8,88 mmol/kg TAG (mg)
MLS1 kontrola (brez dodatka)	20	180	0	0
MLS1 + α -T 0,25 mmol/kg TAG	20	90	90	0
MLS1 + α -T 0,25 mmol/kg TAG + THA 1 mmol/kg TAG	20	67,5	90	22,5
MLS1+ THA 1 mmol/kg TAG	20	157,5	0	22,5
MLS1 + α -T 0,25 mmol/kg TAG + THA 4 mmol/kg TAG	20	0	90	90
MLS1+ THA 4 mmol/kg TAG	20	90	0	90

Legenda: α -T - alfa-tokoferol; GTO - gliceril trioktanoat; TAG – triacilglicerol; THA - triheksilamin

3.2.1.6 Poskus 6: oksidacija lipidov – modelni lipidni sistem 2 (MLS 2)

Pripravili smo 8 mikrocentrifugirk (Preglednica 7), ki so vsebovale po 200 mg ustrezne mešanice metil-linoleata, gliceril-trioktanoata in modelnih antioksidantov. Po 40 mg vzorcev smo prenesli v 15 mL polipropilenske centrifugirke. Eno centrifugirko od vsake mešanice (dan 0) smo takoj zamrznili v skrinji na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostale vzorce smo podvrgli razmeram pospešene oksidacije v temi in jih dali v termostatirano pečico na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posamezne centrifugirke smo odvzeli iz termostatirane pečice po 24 urah (1 dan), 72 urah

(3 dnevi), 120 urah (5 dni) in 168 urah (7 dni) od začetka inkubacije. Vse vzorce do analize smo shranili na -80 °C.

Preglednica 7: Eksperimentalni načrt za sestavo vzorcev modelnega lipidnega sistema (MLS2)

Dodatek Vzorec	Metil- linoleat (mg)	GTO (mg)	α -T s konc. 0,5 mmol/kg TAG (mg)	γ -T s konc. 0,5 mmol/kg TAG (mg)	HA s konc. 8 mmol/kg TAG (mg)	THA s konc. 4 mmol/kg TAG (mg)
MLS2 kontrola (brez dodatka)	20	180	0	0	0	0
MLS2+ α -T 0,25 mmol/kg TAG	20	90	90	0	0	0
MLS2+ α -T 0,25mmol/kg TAG+HA 4mmol/kg TAG	20	0	90	0	90	0
MLS2+ γ -T 0,25mmol/kg TAG	20	90	0	90	0	0
MLS2+ γ -T 0,25mmol/kg TAG+HA 4 mmol/kg TAG	20		0	90	90	0
MLS2+HA 4mmol/kg TAG	20	90	0	0	90	0
MLS2+ γ -T 0,25mmol/kg TAG+THA 4 mmol/kg TAG	20	0	0	90	0	90
MLS2+THA 4mmol/kg TAG	20	90	0	0	0	90

Legenda: α -T - alfa-tokoferol; γ -T – gama-tokoferol; GTO - gliceril trioktanoat; HA – heksilamin; TAG – triacilglicerol; THA - triheksilamin

3.3 KEMIJSKE ANALIZE VZORCEV

3.3.1 Metode za merjenje lipidne oksidacije

Za merjenje lipidne oksidacije v živilih se rutinsko uporablja številne analitske metode, hkrati pa ne obstaja enotna in standardna metoda za merjenje vseh oksidativnih sprememb v vseh živilskih sistemih.

Razpoložljive metode za analizo lipidne oksidacije lahko razdelimo v pet skupin glede na to kaj merijo: porabo kisika, zmanjševanje koncentracije substratov (npr. večkrat nenasičenih MK), tvorbo prostih radikalov, tvorbo primarnih in sekundarnih produktov oksidacije (Shahidi in Zhong, 2005).

3.3.2 Merjenje primarnih produktov oksidacije

3.3.2.1 Peroksidno število (PŠ)

Lipidna oksidacija vključuje kontinuirano tvorbo hidroperoksidov kot primarnih produktov oksidacije, ti pa lahko kasneje oksidirajo do sekundarnih produktov oksidacije. Peroksidno število je indikator začetne stopnje (iniciacije) oksidativnih sprememb.

Analitične metode za merjenje hidroperoksidov v maščobah in oljih lahko razdelimo v dve skupini. Tiste, ki določajo skupno vsebnost hidroperoksidov in tiste, ki s kromatografskim tehnikami dajejo detaljne informacije o strukturi in vrednosti specifičnih hidroperoksidov, ki so prisotni v določenih oljih.

Peroksidno število predstavlja skupno vsebnost hidroperoksidov in je med najpogostejšimi indikatorji kakovosti maščob in olj med proizvodnjo in skladiščenjem. Poznamo številne metode za določitev PŠ, med katerimi so najpogostejše jodometrična titracija, spremljanje oksidacije Fe^{2+} v Fe^{3+} z nastalimi hidroperoksidi in infrardeča spektroskopija (Shahidi in Zhong, 2005).

Oksidacija Fe^{2+} v Fe^{3+} :

Gre za kemijsko metodo, pri kateri se železov Fe^{2+} ion oksidira v železov Fe^{3+} ion. Nastali Fe^{3+} ioni tvorijo so s tiocianatom ali ksilenol oranžnim komplekse, ki absorbirajo v vidnem delu spektra. Ta metoda je hitra, poceni in ni občutljiva na kisik ali svetlobo (Shahidi in Zhong, 2005).

3.3.2.1.1 Določanje peroksidnega števila – spektrofotometrično določanje

Določitev primarnih produktov oksidacije (peroksidov) po reakciji s Fe^{2+} in kompleksaciji nastalega Fe^{3+} z barvilom ksilenol oranžno.

Spektrofotometrično določanje peroksidov temelji na merjenju absorbance obarvanih spojin, ki se tvorijo ob prisotnosti Fe^{3+} in barvila ksilenol oranžno pri 560 nm. Oranžna barva reagenta se ob prisotnosti peroksidov temneje obarva. Temneje kot se obarva, večjo absorbanco izmerimo in večja je posledično koncentracija peroksidov v vzorcu.

Metodo za določanje peroksidnega števila smo modificirali po Gay in sod. (1998).

a.) Priprava reagenta:

Reagent, s katerim določamo perokside smo pripravili tako, da smo v 15 mL plastično centrifugirko odpipetirali 10 mL 250 mM H_2SO_4 v mQ vodi, nato smo v kislini raztopili 7 mg železovega (II) sulfata heptahidrata in 7,6 mg barvila ksilenol oranžno. Raztopino smo dobro premešali na vrtinčniku.

Delovno raztopino reagenta za določanje peroksidov smo pripravili tako da smo v 50 mL centrifugirki zmešali 1 del raztopine v kateri je železov sulfat in barvilo z 9 deli 1-propanola (odpipetiramo 5 ml in 45 ml).

b.) Priprava vzorcev za določanje peroksidov:

Posamezne vzorce, ki so bili shranjeni v 50 mL centrifugirkah (200 mg) smo vzeli iz skrinje ali pečice in jih najprej ohladili oz. ogreli na sobno temperaturo. Nato smo vzorce raztopili v razmerju 1:20 z 1-propanolom (to pomeni, da 200 mg zatehtanega olja raztopimo v 3,8 mL 1-propanola).

V 2 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1470 μ L reagenta in dodajali po 30 μ L vsakega vzorca. Tako je bila končna razredčitev vzorca 1:1000. Vzorce, ki so vsebovali večje koncentracije peroksidov smo še dodatno redčili z 1-propanolom, preden smo jih zmešali s 1470 μ L reagenta. Za slepi vzorec smo dodali 30 μ L 1-propanola 1470 μ L reagenta. Vzorce v mikrocentrifugirkah smo dobro premešali na vrtničniku in jih shranili v temi za 30 minut. Po 30 minutah smo pomerili absorbanco vzorcev na UV-Vis spektrofotometru. Absorbanco vzorcev smo merili v ozkih (1,5 mL) polistirenskih (PS) kivetah. Spektrofotometer smo nastavili na vrednost 0 (autozero) z mQ vodo. Nato smo merili absorbanco slepega vzorca in vseh ostalih vzorcev pri 560 nm. Absorbanco slepega vzorca smo odšteli od absorbanc ostalih vzorcev. Izračunana vrednost je bila osnova za določitev peroksidnega števila olja.

PŠ smo izračunali iz naslednje zveze:

$$P\check{S} = (A_{vz} - A_{svz}) / \epsilon * Rf \quad \dots(22)$$

PŠperoksidno število (mmol/kg)
 A_{vz} absorbanca vzorca
 A_{svz} absorbanca slepega vzorca
 ϵ molarni ekstinkcijski koeficient
 Rf razredčitveni faktor

$$P\check{S} = (A_{vz} - A_{svz}) / 61639 * 20 * 50 * 1000 \quad \dots(23)$$

3.3.2.1.2 Umeritvena krivulja za perokside in priprava standardnih raztopin

Koncentrirano raztopino terciarnega butil-hidroperoksida (t-BuOOH) smo pripravili tako, da smo v 15 mL centrifugirko odpipetirali 9,9 mL 1-propanola in dodali 100 μ L 70 % t-BuOOH. Raztopino smo nato dobro premešali. To je bila raztopina A. Osnovno delovno raztopino t-BuOOH (200 μ M) smo pripravili tako, da smo v 15 mL centrifugirko odpipetirali 9,91 mL 1-propanola in nato dodali 90 μ L raztopine A. Nastalo raztopino (raztopina B) smo dobro premešali.

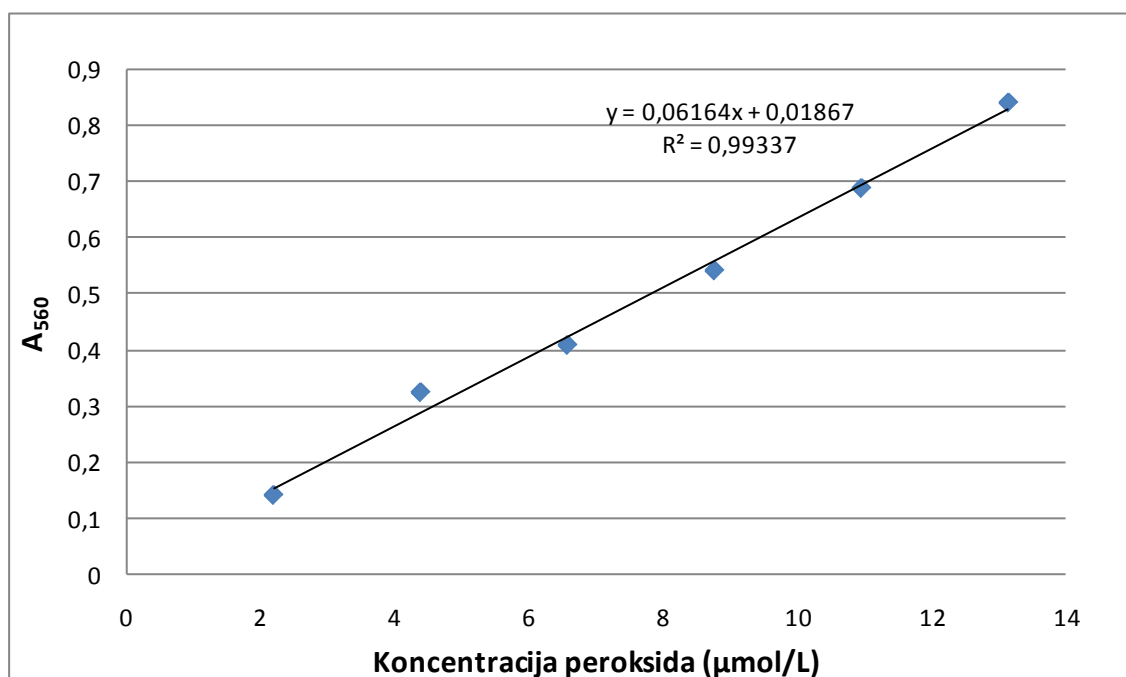
V 1,5 mL plastične mikrocentrifugirke smo odpipetirali raztopini t-BuOOH in 1-propanola različnih volumnov, da smo dobili raztopine ustreznih koncentracij t-BuOOH za umeritveno krivuljo (Preglednica 8).

Preglednica 8: Podatki za umeritveno krivuljo za določanje peroksidov s terciarnim butil-hidroperoksidom (t-BuOOH)

	Volumen raztopine 200 μM t-BuOOH (μL)	Volumen raztopine 1- propanola (μL)
UK1	100	500
UK2	200	400
UK3	300	300
UK4	400	200
UK5	500	100
UK6	600	/

Po 30 μL raztopin (podatki v tabeli) smo zmešali s 1470 μL reagenta. Za slepi vzorec smo 1470 μL reagenta dodali 30 μL 1-propanola. Vse vzorce smo dobro premešali in jih inkubirali v temi 30 minut, da je nastal obarvan kompleks. Po 30-ih minutah smo pomerili absorbanco standardnih raztopin pri 560 nm, pri čemer smo jih prelili v PS kivete za enkratno uporabo.

Iz izmerjene absorbance in množinske koncentracije t-BuOOH smo narisali umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 8.



Slika 8: Umeritvena krivulja za določanje peroksidov s terciarnim butil-hidroperoksidom (t-BuOOH)

3.3.2.2 Konjugirani dieni in trieni

Leta 1933 so ugotovili da tvorba konjugiranih dienov v maščobah in oljih povzroči povišanje absorpcijskih vrhov v UV-območju pri 230-235 nm. V 60-ih letih 20.stol. je monitoring konjugacije dienov postal uporabna tehnika za študij lipidne oksidacije. Konjugirani dieni se tvorijo zaradi preureditve dvojnih vezi med nastankom

hidroperoksidov iz nenasičenih maščobnih kislin. Ti konjugirani dieni močno absorbirajo pri 234 nm.

Povečanje absorpcije v UV-območju je povezano s koncentracijo primarnih oksidacijskih produktov v maščobah in oljih.

Ultravijolična detekcija primarnih produktov je preprosta, hitra in ne zahteva dodatka nobenih kemijskih reagentov. Metoda je manj specifična in občutljiva kot določanje PŠ. Na rezultat lahko vpliva tudi prisotnost nekaterih komponent, ki absorbirajo v enakem območju, npr. prisotnost karotenoidov in tokoferolov (Shahidi in Zhong, 2005).

Z nadaljevanjem lipidne peroksidacije in razpadom hidroperoksidov nastajajo sekundarni produkti s konjugirano triensko strukturo. Ti konjugirani trieni intenzivno absorbirajo pri 268 nm (Shahidi in Zhong, 2005; Wrolstad in sod., 2005).

Povečanje absorpcije v UV-območju teoretično prikaže tvorbo sekundarnih oksidacijskih produktov v maščobah in oljih (Shahidi in Zhong, 2005).

3.3.2.2.1 Absorpcijski spektri v UV – spektrofotometrično določanje

Priprava vzorcev za merjenje absorpcijskih spektrov v UV delu spektra:

Posamezne vzorce, ki so bili shranjeni v 50 mL centrifugirkah (200 mg) smo vzeli iz skrinje ali pečice in jih ohladili oz. ogreli na sobno temperaturo. Nato smo jih raztopili v razmerju 1:20 z 1-propanolom (to pomeni, da 200 mg zatehtanega olja raztopimo v 3,8 mL 1-propanola).

Po 200 µL posameznih vzorcev olj, ki smo jih raztopili v 1-propanolu, smo odpipetrali v 2 mL mikrocentrifugirke. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 1,8 mL 1-propanola, dobro premešali in zaprli. Če je bila absorbanca previsoka (npr. večja od 2), smo vzorec še dodatno redčili z 1-propanolom. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo v 2 mL mikrocentrifugirko odpipetirali 2 mL 1-propanola.

Nato smo vsebino posameznih mikrocentrifugirk kvantitativno prenesli v kvarčne kivete in pomerili absorbanco v UV delu spektra. Instrument smo umerili na vrednost 0 (autozero) z mQ vodo. Najprej smo pomerili absorbanco slepega vzorca in nato vseh ostalih vzorcev. Absorbanco slepega vzorca smo odšteli od absorbanc ostalih vzorcev.

3.3.3 Merjenje sekundarnih produktov oksidacije

3.3.3.1 Para-anizidinsko število (p-AV)

S to metodo merimo vsebnost aldehydov (ponavadi 2-alkenalov in 2,4-alkadienalov), ki se tvorijo med razgradnjo hidroperoksidov. Metoda temelji na barvni reakciji p-anizidina in aldehydnih komponent. Obarvani produkti absorbirajo pri 350 nm. Barvo se ovrednoti in pretvori v p-AV.

Metoda je bolj občutljiva za nenasičene aldehide kot nasičene aldehide, ker obarvani produkti nenasičenih aldehydov močnejše absorbirajo pri tej valovni dolžini. p-AV je zanesljiv indikator oksidativne žarkosti v maščobah, oljih in maščobnih živilih (Shahidi in Zhong, 2005).

3.3.3.1.1 Določanje para-anizidinskega števila – spektrofotometrično določanje

Spektrofotometrično določanje aldehydov temelji na merjenju absorbance obarvanih spojin, ki se tvorijo ob prisotnosti p-anizidina pri 350 nm. Nastali produkti absorbirajo v UV in vidnem delu spektra. Rahlo vijolična barva reagenta se ob prisotnosti aldehydov obarva v rahlo rumeno barvo. Temneje kot se obarva, večjo absorbanco izmerimo in večja je posledično koncentracija aldehydov v vzorcu.

Metodo za določanje para-anizidinskega števila smo modificirali po Labrinea in sod. (2001).

a.) Priprava reagenta:

Reagent, s katerim določamo sekundarne produkte oksidacije smo pripravili tako, da smo v 15 mL centrifugirki pripravili raztopino p-anizidina s koncentracijo 2,5 mg/mL v ledocetni kislini. To pomeni da smo zmešali 25 mg p-anizidina in dodali 10 mL ledocetne kisline in nato dobro premešali na vrtinčniku.

b.) Priprava vzorcev za določanje aldehydov:

Posamezne vzorce, ki so bili shranjeni v 50 mL centrifugirkah (200 mg) smo vzeli iz skrinje ali pečice in jih ohladili oz. ogreli na sobno temperaturo. Nato smo jih raztopili v razmerju 1:20 z 2-propanolom (to pomeni, da 200 mg zatehtanega olja raztopimo v 3,8 mL 2-propanola).

V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 mL razredčenega vzorca (po potrebi smo ga še dodatno redčili), dodali 200 μ L p-anizidina v ledocetni kislini, dobro premešali na vrtinčniku in počakali 10 minut na sobni temperaturi. Za določitev p-anizidinskega števila smo pripravili dva slepa vzorca. Prve slepe vzorce smo pripravili z ustreznimi razredčenimi oljem in ledocetno kislino. V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 mL vzorca, dodali 200 μ L ledocetne kisline, dobro premešali na vrtinčniku in počakali 10 minut na sobni temperaturi. Druge slepe vzorce smo pripravili tako, da smo v 1,5 mL mikrocentrifugirke odpipetirali 1 mL 2-propanola in dodali 200 μ L p-anizidina v ledocetni kislini.

Po 10 minutah inkubacije smo pomerili absorbance vseh raztopin v ozkih polipropilenskih (PP) kivetah pri 350 nm. Spektrofotometer smo nastavili na vrednost 0 (autozero) z mQ vodo. Vsoto absorbanc obeh slepih vzorcev smo odšteli od absorbance vzorca. Izračunana vrednost je bila osnova za določitev para-anizidinskega števila olja.

p-AV smo izračunali iz zveze:

$$p-AV = ((A_s - A_b) - (A_{ss} - A_{sb})) * R_f \quad \dots(24)$$

pAVpara-anizidinska vrednost

A_s absorbanca vzorca pri 350 nm z dodanim p-anizidinom

A_b absorbanca vzorca pri 350 nm brez dodatka p-anizidina

A_{ss} absorbanca slepega vzorca pri 350 nm z dodanim p-anizidinom

A_{sb} absorbanca slepega vzorca pri 350 nm brez dodatka p-anizidina

R_f faktor redčitve

$$p-AV = 20 * 1,2 * ((A_s - A_b) - (A_{ss} - A_{sb})) \quad \dots(25)$$

3.3.3.1.2 Umeritvena krivulja za aldehide in priprava standardnih raztopin

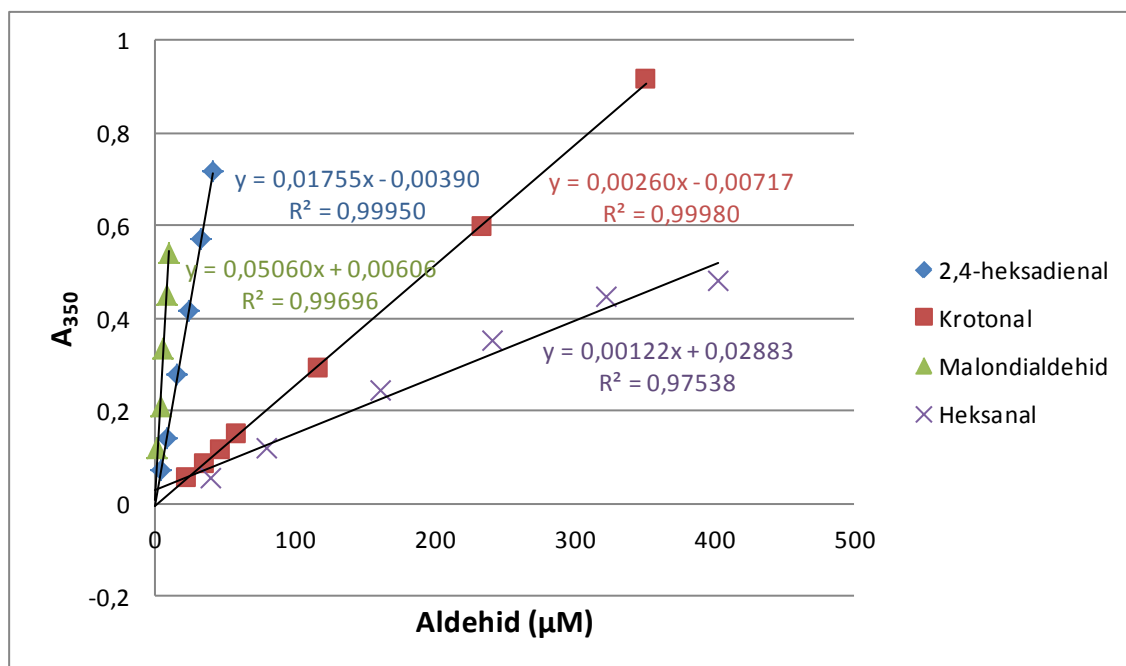
V osnovi smo podajali vsebnost aldehidov (sekundarnih produktov oksidacije) kot p-anizidinsko število. Da bi preverili kakšna je reaktivnost strukturno različnih aldehidov, smo uporabili več različnih vrst aldehidov - heksanal, 2-butenal (krotonal), 2,4-heksadienal ter malondialdehid, ki smo ga sintetizirali iz tetraoksi propana (TEP).

Malonidialdehid smo pripravili kot je opisano v Tsaknis in sod. (1988). Najprej je morala poteči hidroliza tetraetoksi propana (TEP) v malondialdehid. Kislo hidrolizo TEP v malodialdehid smo izvedli tako, da smo v stekleno vialo najprej dali 80 μ L TEP in nato dodali raztopino 20 μ L 250 mM H_2SO_4 in 60 μ L mQ vode. Potem smo vialo kuhali v vreli vodi 5 minut. Vialo smo nato ohladili in dodali 640 μ L mQ vode. Na osnovi literaturnih podatkov naj bi tako pripravili ≈ 4 mM malondialdehid.

Natančno koncentracijo smo določili z merjenjem absorbance razredčenih raztopin ob upoštevanju podatka, da je molarni absorpcijski koeficient malondialdehida pri 267 nm 31800 $L * mol^{-1} * cm^{-1}$.

Vse standardne raztopine smo redčili z 2-propanolom do raztopin ustreznih koncentracij, ki smo jih uporabili za pripravo umeritvene krivulje. Za pripravo umeritvenih krivulj smo 20 μ L ustrezno razredčenih standardov zmešali z 980 μ L 2-propanola in 200 μ L p-anizidina v ledocetni kislini ter postopali na enak način kot pri določitvi p-anizidinskega števila.

Iz izmerjenih absorbanc (upoštevajoč slepi probi) smo pripravili umeritvene krivulje odvisnosti absorbance pri 350 nm od koncentracije posameznega aldehida v vzorcu (slika 9).



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje aldehydov: Reaktivnost aldehydov v p-anizidinskem testu

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ OSNOVNIH VZORCEV OLJA IN MODELNIH LIPIDNIH SISTEMOV

4.1.1 Rezultati meritev kemijskih analiz vzorcev mešanic rafiniranega oljčnega olja in lanenega olja

V okviru osnovnega poskusa smo analizirali vpliv večjih koncentracij baze triheksilamina in palmitinske kisline na potek oksidacije v mešanicah oljčnega in lanenega olja. Pripravili smo mešanici, ki vsebujeta 10 %, oziroma 50 % lanenega olja. Tako pripravljene mešanice se razlikujeta v vsebnosti linolenske kisline, kakor tudi v vsebnosti α -tokoferola (rafinirano oljčno olje) in γ -tokoferola (laneno olje). Največji dodatek kisline, oziroma baze v mešanico olja je bil 1%. Mešanice olj z različno vsebnostjo THA in PK smo inkubirali na 60 °C. V ustreznih časovnih intervalih smo vzorčili oksidirana olja in v njih določali vsebnost peroksidov, p-anizidinsko število ter pomerili spektre olj v UV območju.

4.1.1.1 Peroksidi

Pri dnevu 0 je bila izmerjena vsebnost peroksidov pri kontrolnih vzorcih v mešanici olja z 10 % lanenega olja (5,4 mmol/kg) višja kot pri mešanici s 50 % lanenega in 50 % oljčnega olja (3,6 mmol/kg). Dodatek palmitinske kisline in triheksilamina ni značilno vplival na določeno vsebnost peroksidov ob dnevu 0. Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelarnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 1 in A 2. Rezultati so prikazani v obliki grafa na slikah 10 in 11.

Dan 1:

V obeh kontrolnih vzorcih smo po dnevu 1 določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost peroksidov v mešanici (10, 6 mmol/kg), ki je vsebovala 50 % lanenega olja, je bila večja kot v 10 % lanenem olju (7,8 mmol/kg). Dodatek triheksilamina je močno zavrl peroksidacijo lipidov v obeh mešanicah olj. Pri obeh večjih koncentracijah smo določili celo zmanjšano vsebnost le-teh, kar lahko pripišemo razgradnji peroksidov, ki so bili že na začetku prisotni v oljih. Dodatek palmitinske kisline je imel majhen vpliv na nastanek peroksidov v primeru mešanice z 10 % lanenega olja, medtem ko smo v mešanici s 50 % lanenega olja določili nekaj manjše vsebnosti peroksidov kot v kontrolnem vzorcu po dnevu 1, predvsem pri višji koncentraciji palmitinske kisline.

Dan 4:

Po štirih dneh inkubacije smo za kontrolna vzorca ugotovili izrazito povečanje vsebnosti peroksidov. V 50 % odstotnem lanenem olju se je vsebnost le teh povečala za 35x v primerjavi z dnevom 0, v 10 % lanenem olju pa za 2,7x. V obeh mešanicah olj je imel triheksilamin izjemno velik vpliv na potek oksidacije. Vsebnost peroksidov je bila v obeh

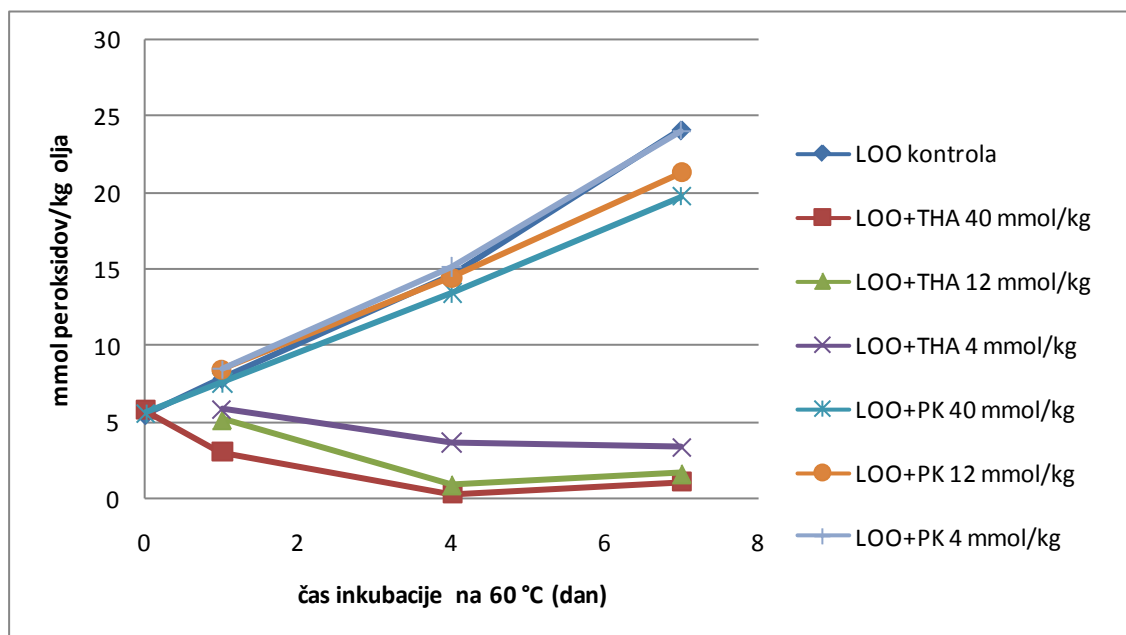
mešanicah olj in vseh uporabljenih koncentracijah triheksilamina celo manjša kot ob dnevu 0. V mešanicah z največjim dodatkom triheksilamina smo določili samo 6 % začetne vsebnosti peroksidov. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom triheksilamina po dnevu 4 je bila pri 50 % lanenem olju, ko smo za največji dodatek triheksilamina določili za $\approx 500x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po štirih dneh inkubacije.

Dodatek palmitinske kisline v 10 % laneno olje je le malo vplival na vsebnost peroksidov pri vseh treh koncentracijah, saj so bile razlike v primerjavi s kontrolnim vzorcem izjemno majhne. Podobno kot po dnevu 1 smo za 50 % laneno olje ugotovili, da je dodatek palmitinske kisline zmanjšal vsebnost peroksidov v olju. Učinek je bil odvisen od koncentracije, saj smo pri najvišji koncentraciji palmitinske kisline določili le 35 % vsebnosti peroksidov v primerjavi s kontrolnim vzorcem, medtem ko je bila pri najnižji koncentraciji vsebnost peroksidov 76 % kontrolnega vzorca.

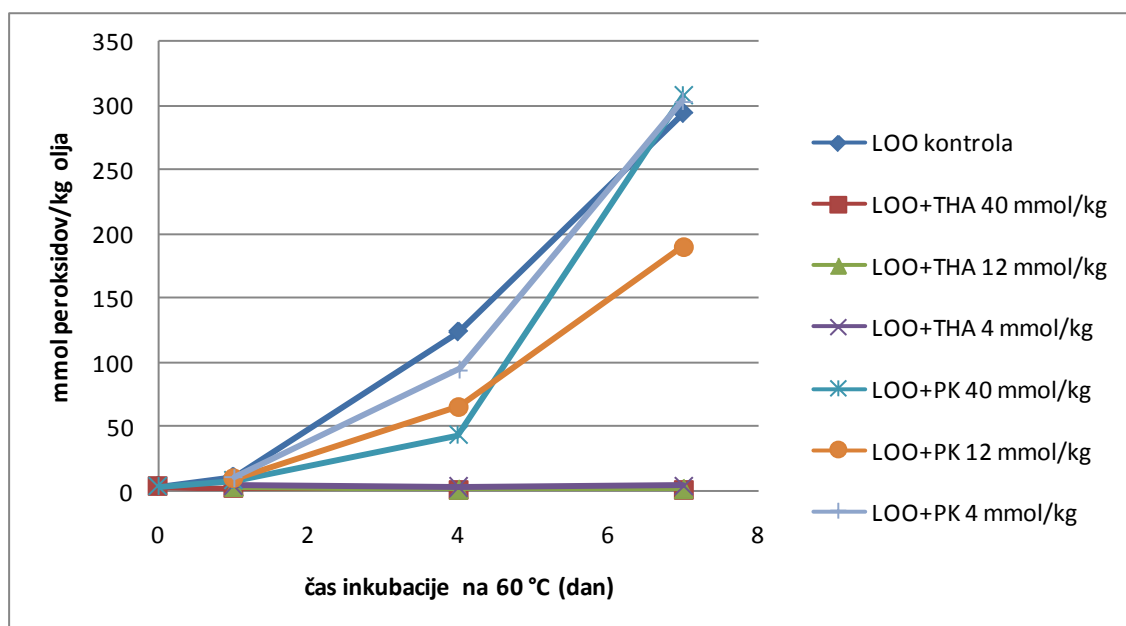
Dan 7:

Po sedmih dneh inkubacije smo v kontrolnih vzorcih zaznali še večje vsebnosti peroksidov kot po dnevu 4. V 50 % odstotnem lanenem olju se je vsebnost le teh povečala za 83x v primerjavi z dnevom 0, v 10% lanenem olju pa za 4,4x. Tako kot po dnevu 4 je imel triheksilamin še vedno zelo velik vpliv na potek oksidacije. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom triheksilamina po dnevu 7 je bila pri 50 % lanenem olju, ko smo za največji dodatek triheksilamina določili za $\approx 300x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po štirih dneh inkubacije.

Dodatek palmitinske kisline v 10 % laneno olje je le malo vplival na vsebnost peroksidov. Pri obeh višjih koncentracijah palmitinske kisline smo določili celo manjšo vsebnost peroksidov v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri 50 % olju pa smo po sedmih dneh inkubacije določili zmanjšano vsebnost peroksidov le pri srednji koncentraciji palmitinske kisline.



Slika 10: Vsebnost peroksidov v mešanici z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanici so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).



Slika 11: Vsebnost peroksidov v mešanici s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanici so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).

Primerjava učinka triheksilamina in palmitinske kisline primerljivih molarnih (in masnih) koncentracij kaže nato, da ima baza precej večji vpliv na potek oksidacije.

Rezultati kažejo na to, da je bilo olje s 50 % lanenega olja bolj podvrženo oksidaciji kot olje z 10 % lanenega olja. Laneno olje je zaradi večkrat nenasičenih maščobnih kislin manj

stabilno kot oljčno olje, ki vsebuje večinoma enkrat nenasičene maščobne kisline (oleinsko kislino).

Baza triheksilamin je dobro delovala na upočasnitev oksidacijskih procesov in posledično na zmanjšanje vsebnosti peroksidov pri obeh mešanicih olj, nekoliko bolje se je odrezala pri mešanici z višjo vsebnostjo lanenega olja. Triheksilamin je kot antioksidant deloval najverjetneje zaradi svoje amino skupine, ki deluje kot lovilec prostih radikalov. Glede na to da je linolna kislina med prevladujočimi v lanenem olju (poleg linolenske) in v rafiniranem oljčnem olju (poleg oleinske), lahko naš eksperiment primerjamo s študijo, omenjeno v pregledu objav, kjer sta podobno antioksidativno delovanje aminov dokazala že Yen in Kao (1992) z dodatkom poliaminov linolni kislini.

Yi in sod. (2003) navajajo da imajo v oljih večji prooksidativni učinek proste maščobne kisline s krajšimi verigami in višjo stopnjo nenasičenosti. Palmitinska maščobna kislina je v večini vplivala na obe mešanici olj tako, da se je vsebnost peroksidov povečala, predvsem pri nižji koncentraciji. Palmitinska kislina je nasičena maščobna kislina, zato morda na povišanje oksidacijskih procesov ni imela večjega vpliva, čeprav je pri podobni študiji Yoshida in sod. (1992) dodatek palmitinske kisline kot proste maščobne kisline olju vplival na pospešitev oksidacijskih procesov. Prav tako so v njihovi študiji višje koncentracije proste palmitinske kisline bolj vplivale na pospešitev oksidacijskih procesov, v našem primeru pa so na pospešitev oksidacijskih procesov bolj vplivale nižje koncentracije in srednje koncentracije.

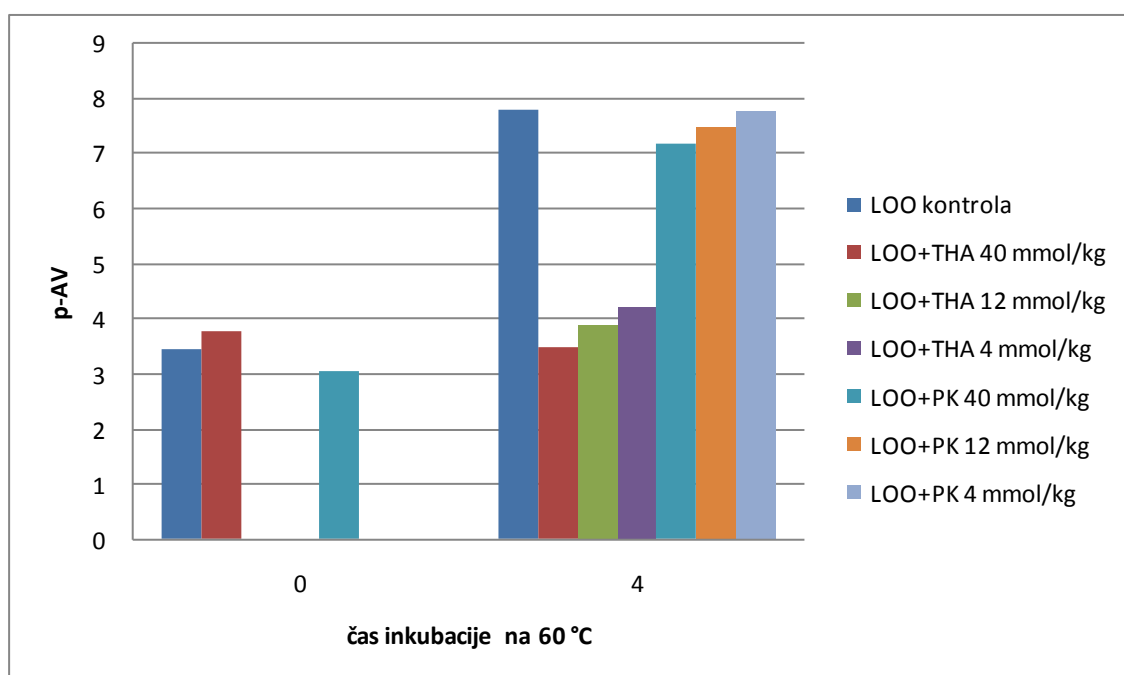
4.1.1.2 p-anizidinsko število

Para-anizidinsko število smo določili za mešanice olj brez dodatka ter za mešanice z največjimi vsebnostmi palmitinske kisline in triheksilamina ob dnevu nič in za vse kombinacije po štirih dneh inkubacije. Izmerjena p-anizidinska števila za 10 % laneno olje so prikazana na sliki 12 ter za 50 % laneno olje na sliki 13. TABELARIČNE VREDNOSTI SO PRIKAZANE V PRILOGI B 1 IN B 2.

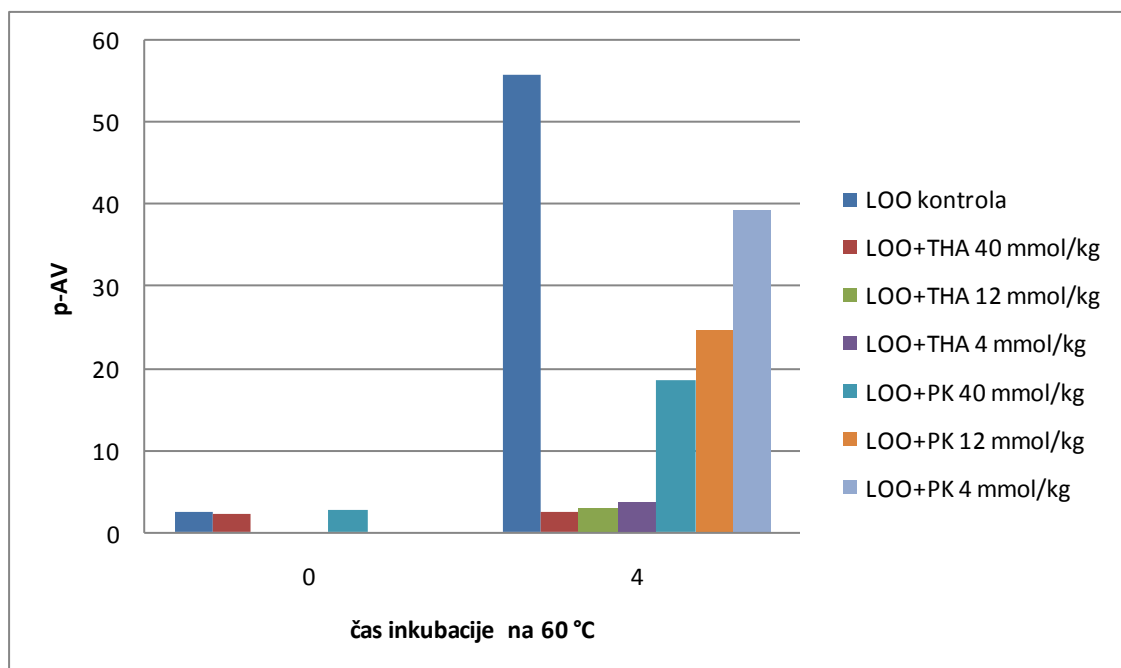
Začetno p-anizidinsko število je bilo večje pri 10% lanenem olju ($\approx 3,5$) kot v 50 % lanenem olju ($\approx 2,5$) kar se sklada s podatki o peroksidnem številu, ki je bilo ob dnevu 0 ravno tako višje pri mešanici z manjšim deležem lanenega olja. Dodatek visokih koncentracij palmitinske kisline in triheksilamina ob dnevu 0 ni bistveno vplival na določeno p-anizidinsko število. Po štirih dneh inkubacije je p-AV kontrolnega vzorca s 50 % lanenega olja precej večji kot p-AV 10 % lanenega olja kar se sklada z manjšo vsebnostjo linolenske kisline in nastalih peroksidov v mešanici z 10 % lanenega olja.

Analiza rezultatov po 4 dneh inkubacije razkrije, da dodatek palmitinske kisline rezultira v manjšem p-AV v obeh oljih v primerjavi s kontrolama. Vpliv palmitinske kisline je še posebej izrazit pri mešanici s 50 % lanenega olja, kjer je opazna koncentracijska odvisnost vpliva kisline. Pri največjem dodatku PK določimo le 33 % vrednosti kot v kontrolnem vzorcu po štirih dneh inkubacije. Učinek je manj izrazit pri najnižji koncentraciji, toda tudi

tu je p-AV ≈ 70 % kontrolnega vzorca. Ti rezultati se skladajo s podatki o peroksidnem številu, kjer smo po dnevu 4 ravno tako določili zaviralni vpliv kisline na peroksidacijo. Na ta način smo tudi pokazali, da manjše peroksidno število ni posledica pospešene razgradnje peroksidov v sekundarne produkte oksidacije. Triheksilamin ima še večji vpliv na tvorbo aldehydov (p-AV), saj z izjemo najnižje koncentracije v 50 % lanenem olju po štiridnevni inkubaciji določimo celo manjše p-AV kot v mešanici olj pred začetkom inkubacije. Ker so dodatki palmitinske kisline in triheksilamina rezultirali v primerljivih učinkih na vsebnost peroksidov in aldehydov (p-AV) (proporcionalno zmanjšanje), smo se odločili, da bomo pri vrednotenju ostalih olj uporabili le določitev vsebnosti peroksidov, saj je metoda precej bolj občutljiva in posledično napake meritve manjše kot določevanju p-AV.



Slika 12: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).



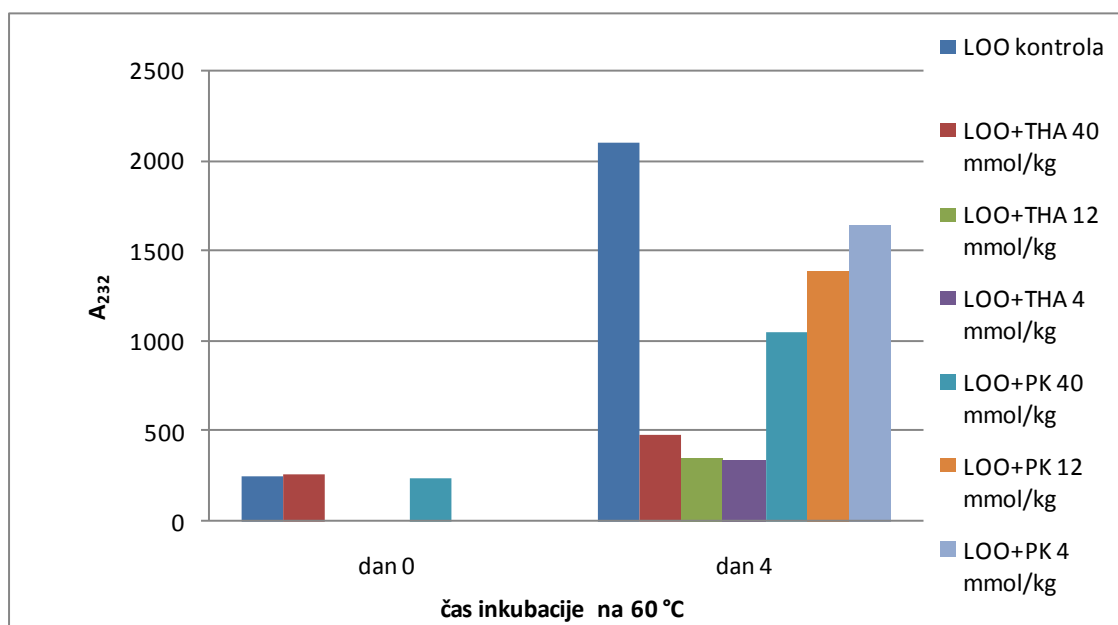
Slika 13: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).

4.1.1.3 Konjugirani dieni in trieneni

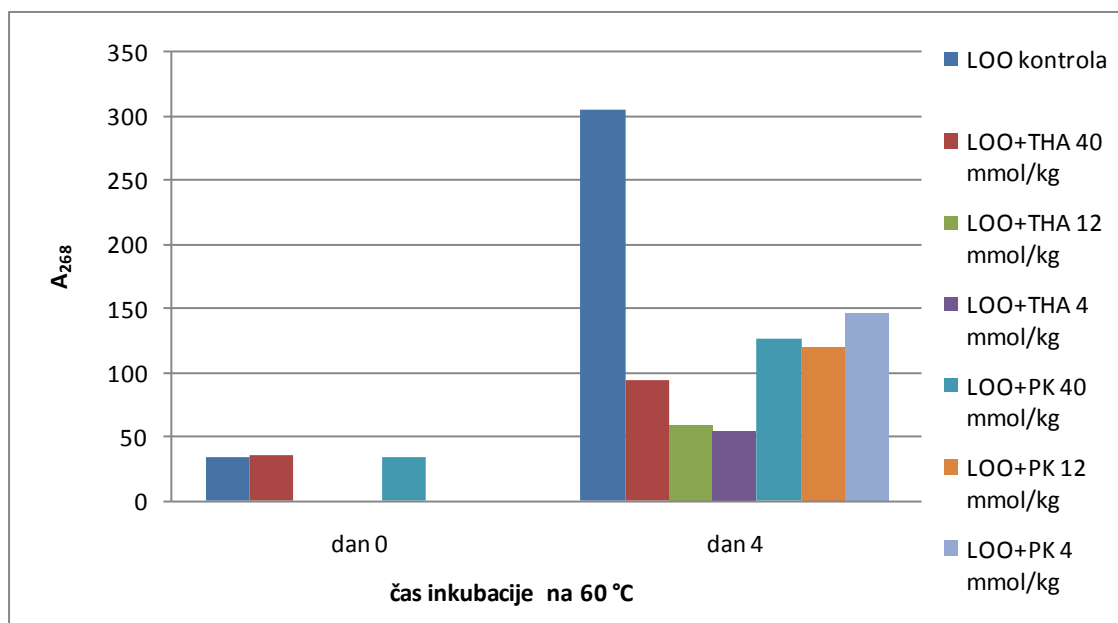
Razredčenim raztopinam vzorcev olj v 1-propanolu smo posneli absorpcijske spektre v UV delu spektra ter odčitali absorbance pri 232 nm, ki so merilo za koncentracijo konjugiranih dienov, ter absorbance pri 268 nm, ki predstavlja merilo za koncentracijo konjugiranih trienov v vzorcu. Konjugirani trieneni nastanejo predvsem pri oksidativnih pretvorbah linolenske kisline. Vrednosti absorbanc za posamezne vzorce, ki so pomnožene z ustreznimi razredčitvami, so prikazane na slikah 14, 15, 16 in 17.

Dodatek palmitinske kisline in triheksilamina le malo vplivajo na absorbance vzorcev 50 % lanenega olja pred inkubacijo pri 232 in 268 nm. Po štirih dneh na 60 °C se poveča absorbance kontrolnega vzorca tako pri 232 kot pri 268 nm. Pri obeh valovnih dolžinah so absorbance manjše tako v prisotnosti triheksilamina kot palmitinske kisline. Učinek palmitinske kisline pri 232 nm je primerljiv z meritvami peroksidnega števila in p-AV, saj ima največji učinek večja koncentracija kisline. Triheksilamin še bolj zmanjša povečanje absorbance, vendar ima največja koncentracija baze manjši vpliv, kar je še bolj izrazito pri 268 nm.

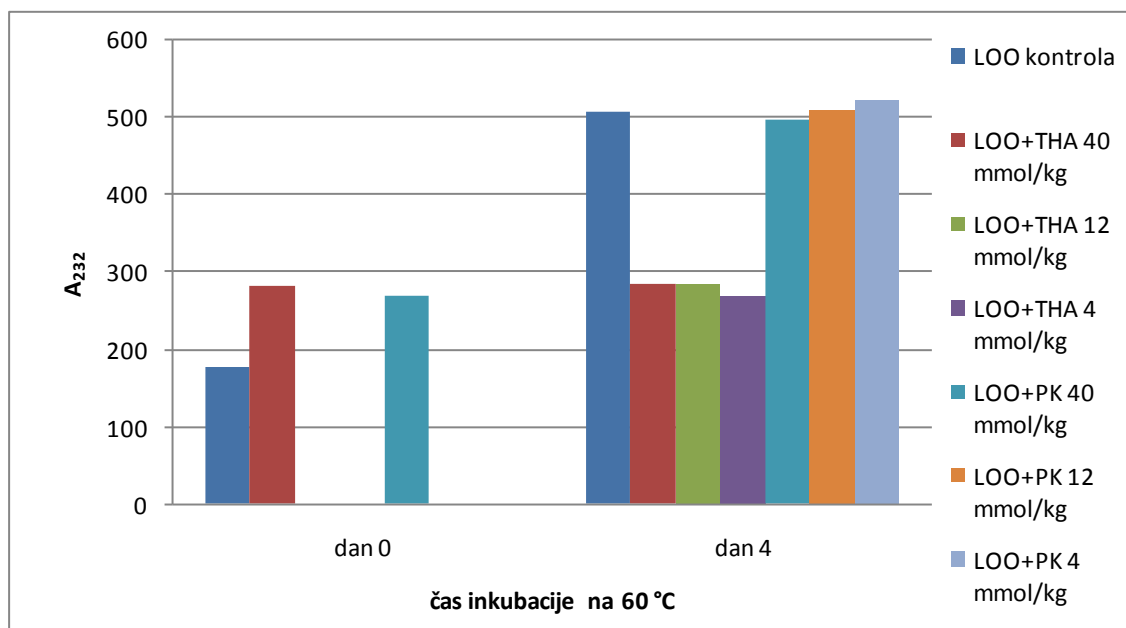
Sprememba absorbance pri 232 nm in 268 nm kot posledica inkubacije pri 60 °C je precej manj izrazita za kontrolne vzorce 10 % lanenega olja. Pri 268 nm se vzorci z dodatki po inkubaciji razlikujejo za manj od 20 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri 232 nm za vse tri koncentracije triheksilamina izmerimo za ≈50 % manjšo absorbance v primerjavi s kontrolnim vzorcem, medtem ko dodatek kisline ne vpliva na izmerjeno absorbance.



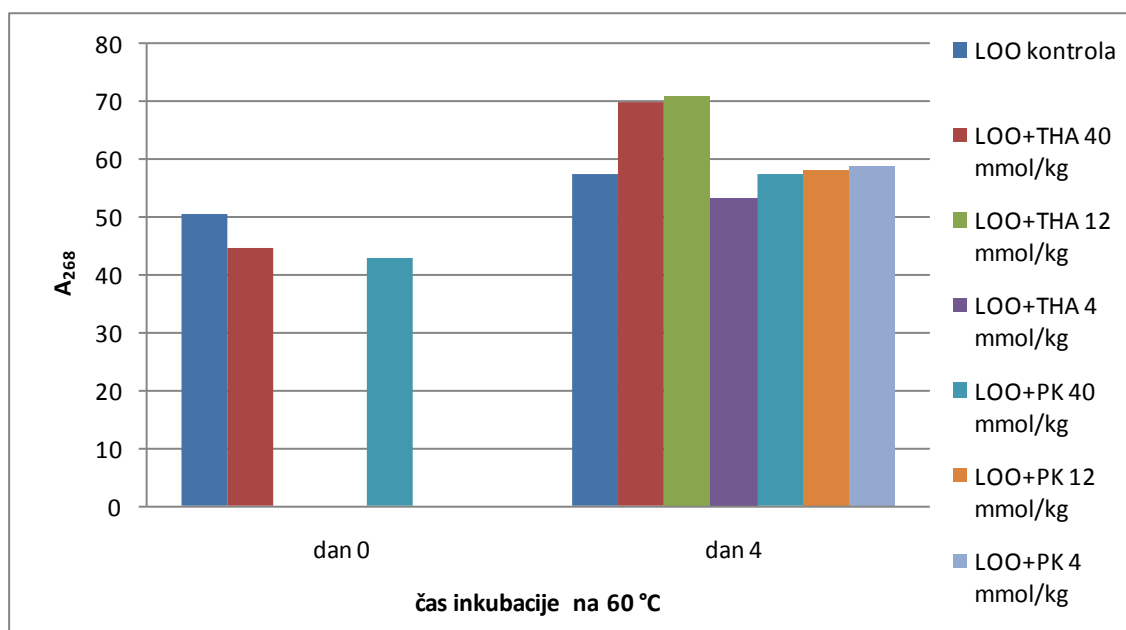
Slika 14: Konjugirani dieni v mešanici s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanici so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).



Slika 15: Konjugirani trieni v mešanici s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanici so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).



Slika 16: Konjugirani dieni v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).



Slika 17: Konjugirani trieni v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) po inkubaciji na 60 °C. Mešanicam so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in palmitinske kisline (PK).

4.1.2 Rezultati meritev kemijskih analiz vzorcev lanenega olja in rafiniranega sončničnega olja

V okviru poskusa smo analizirali vpliv različnih koncentracij baz triheksilamina in heksilamina na potek oksidacije v lanenem olju in rafiniranem sončničnem olju. Ti dve vrsti olja se razlikujeta v vsebnosti večkrat nenasičene linolenske kisline (več je vsebuje laneno olje), kakor tudi v vsebnosti α -tokoferola (sončnično olje) in γ -tokoferola (laneno olje). Največji dodatek baze v olje je bil 16 mmol/kg. Obe vrsti olj z različno vsebnostjo THA in HA smo inkubirali na 60 °C. V ustreznih časovnih intervalih smo vzorčili oksidirana olja in v njih določali vsebnost peroksidov. Pri tem poskusu smo tudi preverjali, kako oksidacijski procesi vplivajo na izgubo karotenoidov v lanenem olju. Zanimalo nas je, ali dodatek baz lahko vpliva na upočasnitev oksidacijskih procesov in s tem na ohranitev karotenoidov v lanenem olju.

4.1.2.1 Peroksidi

Pri dnevu 0 je bila izmerjena vsebnost peroksidov pri kontrolnih vzorcih v sončničnem olju (2,3 mmol/kg) višja kot pri lanenem olju (1,8 mmol/kg). Dodatek triheksilamina in heksilamina ni značilno vplival na določeno vsebnost peroksidov ob dnevu 0. Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelarnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 3 in A 4. Rezultati so prikazani v obliki grafa na slikah 18 in 19.

Dan 1: V obeh kontrolnih vzorcih smo po dnevu 1 določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost peroksidov v sončničnem olju (9,2 mmol/kg), je bila večja kot v lanenem olju (7,1 mmol/kg). Dodatek triheksilamina je zavrl peroksidacijo lipidov v obeh oljih, razen v primeru dodatka nizke koncentracije v sončnično olje. Pri obeh večjih koncentracijah triheksilamina smo določili celo zmanjšano vsebnost peroksidov, kar lahko pripišemo razgradnji peroksidov, ki so bili že na začetku prisotni v oljih. Dodatek heksilamina je prav tako zavrl peroksidacijo lipidov v obeh oljih.

Dan 3: Po treh dneh inkubacije smo za kontrolna vzorca ugotovili izrazito povečanje vsebnosti peroksidov. V lanenem olju se je vsebnost le-teh povečala za 100x v primerjavi z dnevom 0, v sončničnem olju pa za 14x. V obeh oljih je imel triheksilamin velik vpliv na potek oksidacije, še posebno v lanenem olju. Vsebnost peroksidov je bila v lanenem olju in pri največji koncentraciji triheksilamina celo manjša kot ob dnevu 0. V lanenem olju z največjim dodatkom triheksilamina smo določili samo 34 % začetne vsebnosti peroksidov. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom triheksilamina po dnevu 3 je bila pri lanenem olju, ko smo za največji dodatek triheksilamina določili za $\approx 300x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolo po treh dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 18 % kontrolnega vzorca.

Pri sončničnem olju smo po dnevu 3 pri največjem dodatku triheksilamina določili za $\approx 14x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 25 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina pa je bila vsebnost peroksidov za 23 % večja od kontrolnega vzorca.

Pri heksilaminu je bila največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom heksilamina pri lanenem olju, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 50x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolo po treh dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 21 % kontrolnega vzorca.

Pri sončničnem olju smo po dnevu 3 pri največjem dodatku heksilamina določili za $\approx 3x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 78 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji heksilamina pa je znašala vsebnost peroksidov 99 % kontrolnega vzorca.

Dan 5: Po petih dneh inkubacije smo v kontrolnih vzorcih zaznali še večje vsebnosti peroksidov kot po dnevu 3. V lanenem olju se je vsebnost le-teh povečala za $220x$ v primerjavi z dnevom 0, v sončničnem olju pa za $23x$. Vsebnost peroksidov je v lanenem olju in pri največji koncentraciji triheksilamina podobno kot pri dnevu 3 celo manjša kot ob dnevu 0. V lanenem olju z največjim dodatkom triheksilamina smo določili samo 40 % začetne vsebnosti peroksidov. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom triheksilamina po dnevu 5 je bila pri lanenem olju, ko smo za največji dodatek triheksilamina določili za $\approx 500x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po petih dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 43 % kontrolnega vzorca.

Pri sončničnem olju smo po dnevu 5 pri največjem dodatku triheksilamina določili za $\approx 30x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po petih dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 14 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina pa je bila vsebnost peroksidov večja za 12 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Pri heksilaminu, ki je manj zaviral peroksidacijo od triheksilamina, je bila največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom heksilamina po dnevu 5 pri lanenem olju, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 10x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po petih dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 91 % kontrolnega vzorca.

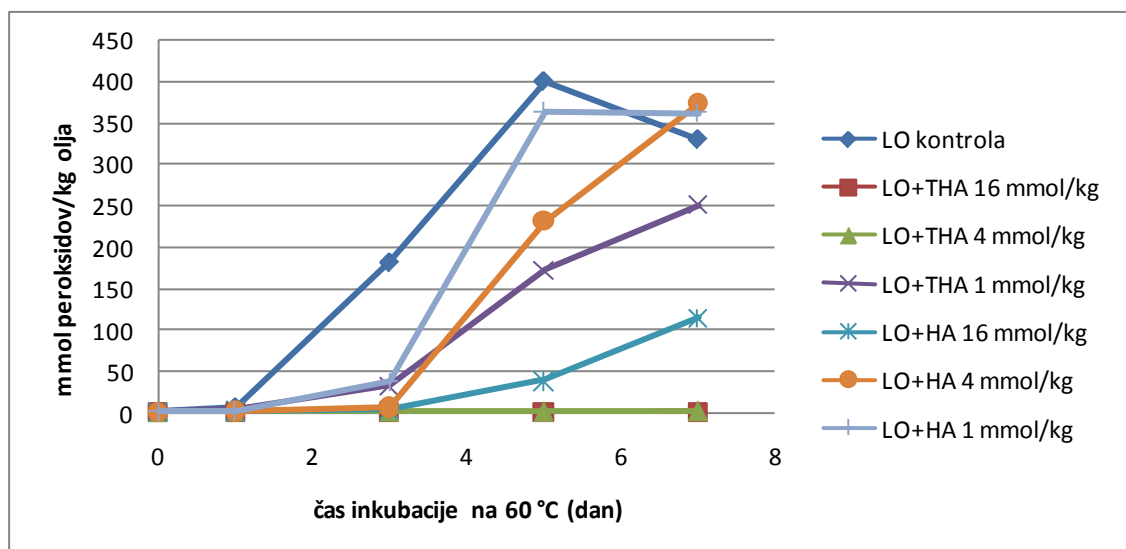
Pri sončničnem olju smo po dnevu 5 pri največjem dodatku heksilamina določili za $\approx 2x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji heksilamina je bila vsebnost peroksidov 57 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji heksilamina pa je bila vsebnost peroksidov večja za 90 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Dan 7: Po sedmih dneh inkubacije so peroksidi še vedno naraščali le v sončničnem olju, ko smo določili za 29x večjo vsebnost kot ob dnevu 0. V lanenem olju je bila vsebnost peroksidov po sedmih dneh inkubacije nižja kot po petih dneh inkubacije, kar najverjetneje lahko pripišemo razgradnji peroksidov v sekundarne produkte. V obeh oljih je imel triheksilamin, podobno kot pri prejšnjih dneh, še vedno velik vpliv na potek oksidacije, še posebno v lanenem olju. Vsebnost peroksidov je bila v lanenem olju in pri največji koncentraciji triheksilamina zopet manjša kot ob dnevu 0. V lanenem olju z največjim dodatkom triheksilamina smo določili 74 % začetne vsebnosti peroksidov. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom triheksilamina po dnevu 7 je bila pri lanenem olju, ko smo za največji dodatek triheksilamina določili za $\approx 250x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolo po sedmih dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina je bila vsebnost peroksidov 76 % kontrolnega vzorca ob dnevu 7.

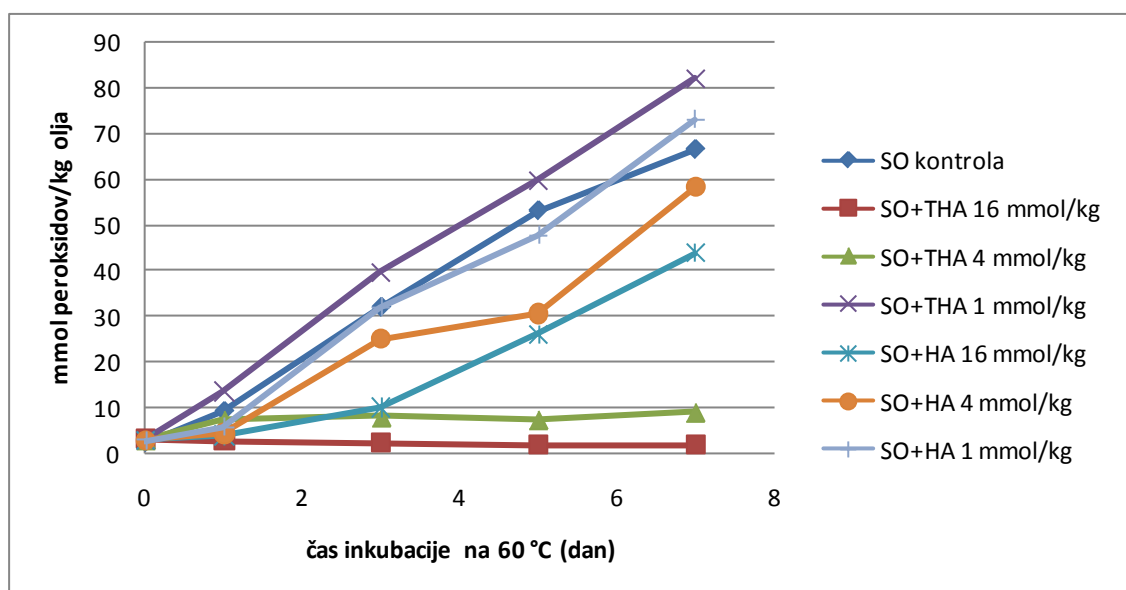
V sončničnem olju z največjim dodatkom triheksilamina smo določili 86 % začetne vsebnosti peroksidov. Pri sončničnem olju smo po dnevu 7 pri največjem dodatku triheksilamina določili za $\approx 30x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po sedmih dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 13 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina pa je bila vsebnost peroksidov večja za 23 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Nekoliko slabše se je zopet odrezal heksilamin. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom heksilamina po dnevu 7 je bila pri lanenem olju, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 3x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po sedmih dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji heksilamina je bila vsebnost peroksidov 9 % večja kot pri kontrolnem vzorcu.

Pri sončničnem olju smo po dnevu 7 pri največjem dodatku heksilamina določili za $\approx 1,5x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji heksilamina je bila vsebnost peroksidov 58 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji heksilamina pa je bila vsebnost peroksidov 10 % večja kot pri kontrolnem vzorcu.



Slika 18: Vsebnost peroksidov v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in heksilamina (HA).



Slika 19: Vsebnost peroksidov v rafiniranem sončničnem olju (SO) po inkubaciji na 60 °C. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA) in heksilamina (HA).

Rezultati kažejo na to, da je laneno olje veliko bolj podvrženo procesu oksidacije. Ker imata sončnično in laneno olje približno enak delež nasičenih maščobnih kislin, je laneno olje bolj podvrženo oksidaciji zaradi višjega deleža večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Predvsem zaradi treh dvojnih vezi, ki so del linolenske kisline, ki je laneno olje vsebuje več kot pa sončnično. Sončnično olje vsebuje več linolne kisline, ki ima dve dvojni vezi in je zato bolj stabilno (Kostik in sod., 2013).

Izkazalo se je, da pri lanenem olju na upočasnitev procesov oksidacije bolj vpliva triheksilamin kot heksilamin. Amini po navedbi Dasa in Misre (2004) lahko delujejo kot antioksidanti zaradi svoje amino skupine kot lovilci prostih radikalov in kot kelatorji

kovinskih ionov. V študiji Toro-Funesove in sod. (2011) so imeli amini z večjim številom amino skupin večjo antioksidativno učinkovitost. Heksilamin in triheksilamin imata sicer enako število amino skupin (eno), a se vseeno razlikujeta v strukturi, saj je heksilamin primarni amin, triheksilamin pa terciarni amin. Triheksilamin ima vse tri vodikove atome zamenjane z organsko substituentom. Večjo antioksidativno učinkovitost bi v našem primeru tako tudi lahko pripisali razliki v strukturi.

Prav tako se je izkazalo, da bazi bolje delujeta na upočasnitev procesov oksidacije pri lanenem olju kot pri sončničnem olju. To morda nakazuje na to, da bazi sinergistično delujeta z γ -tokoferolom, ki ga je več v lanenem olju, kot pa v sončničnem olju, ki vsebuje največ α -tokoferola.

4.1.2.2 Karotenoidi

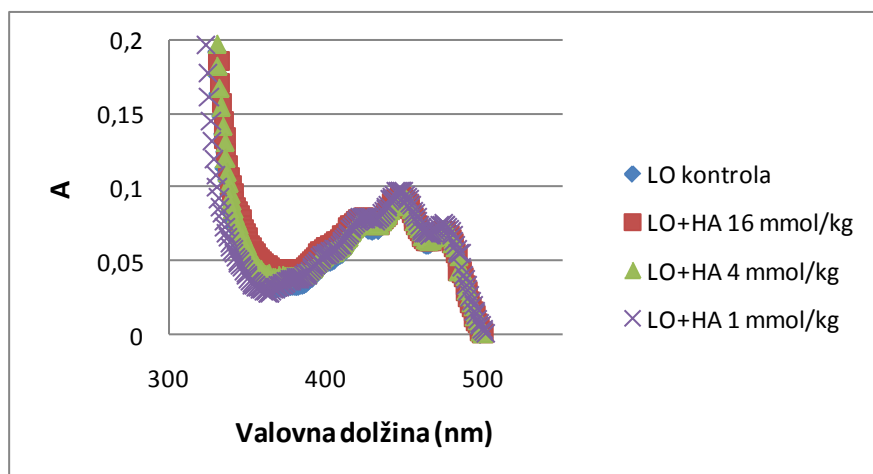
Razredčenim raztopinam vzorcev olj v 1-propanolu smo posneli absorpcijske spektre v vidnem delu spektra ter odčitali absorbance pri 400-500 nm, kjer absorbirajo karotenoidi. Karotenoidi so velika skupina organskih pigmentov, ki jih najdemo tudi v rastlinskih oljih. Prisotnost β -karotena v oljih je zelo pomembno, saj je učinkovit naravni antioksidant. Deluje kot lovilec prostih radikalov. Zaradi svoje sestave (nenasičene molekule) so karotenoidi podvrženi procesom oksidacije. Izguba karotenoidov v olju pomeni, da se v olju odvijajo procesi oksidacije (Rafalowski in sod., 2008).

Absorpcijski spektri za posamezne vzorce lanenih olj, za katere smo na osnovi preliminarnih analiz ugotovili (absorpcijski spekter), da vsebujejo beta-karoten so prikazane na slikah 20, 21, 22, 23, 24 in 25.

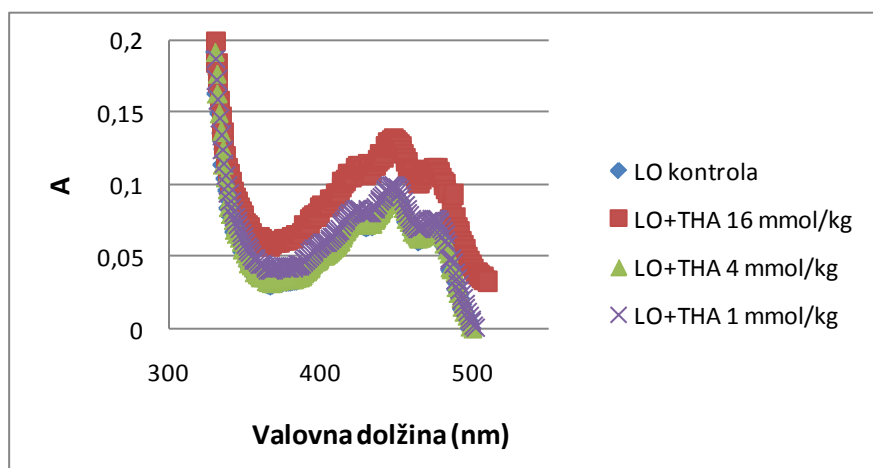
Pred inkubacijo pri dnevu 0 dodani antioksidanti ne vplivajo na absorpcijske spektre karotenoidov.

Po treh dneh inkubacije oksidacijski procesi že močno vplivajo na izgubo karotenoidov v kontrolnem vzorcu lanenega olja, saj ni več značilnega absorpcijskega profila beta-karotena. V prisotnosti 4 mM in 16 mM THA in HA ni opaziti sprememb v spektru glede na dan 0, medtem ko je za najnižjo koncentracijo THA in HA (1 mM) razvidno, da je prišlo do zmanjšanja absorbance ter posledično koncentracije beta-karotena. Učinki baz so primerljivi z meritvami peroksidnega števila, saj so imele največji učinek večje koncentracije.

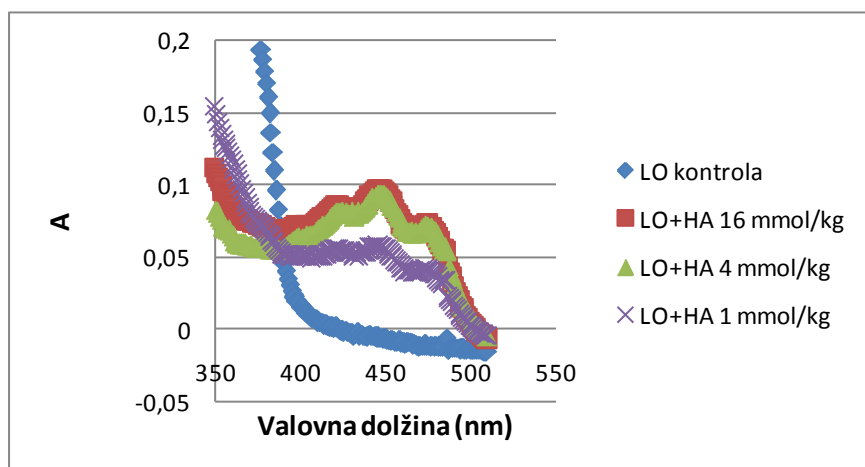
Po petih dne inkubacije se je beta-karoten ohranil le v prisotnosti 4 in 16 mM THA ter 16 mM HA, medtem ko je v vseh ostalih primerih prišlo do popolne razgradnje beta-karotena.



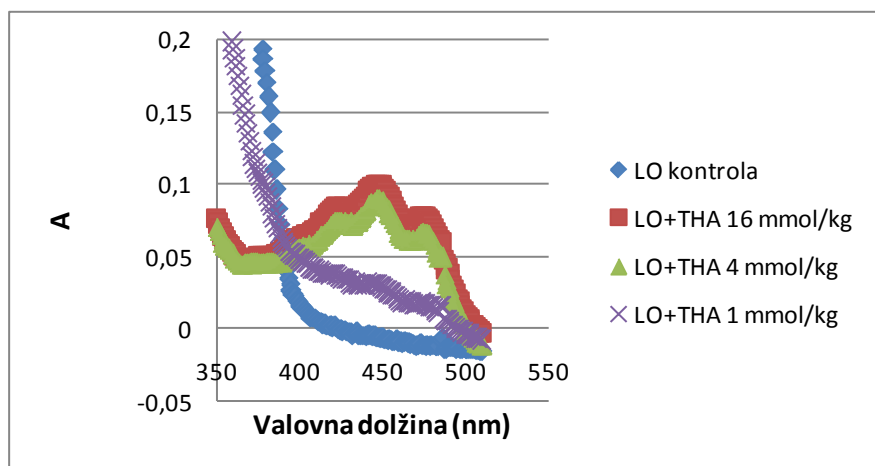
Slika 20: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 0. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA).



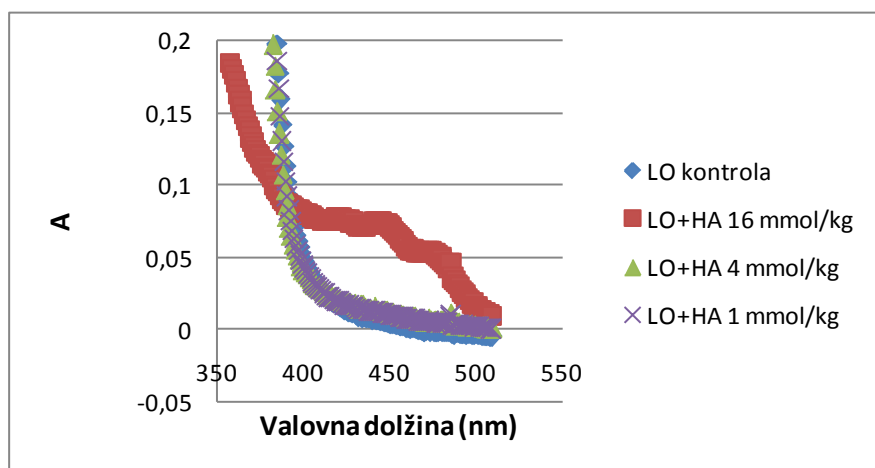
Slika 21: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 0. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA).



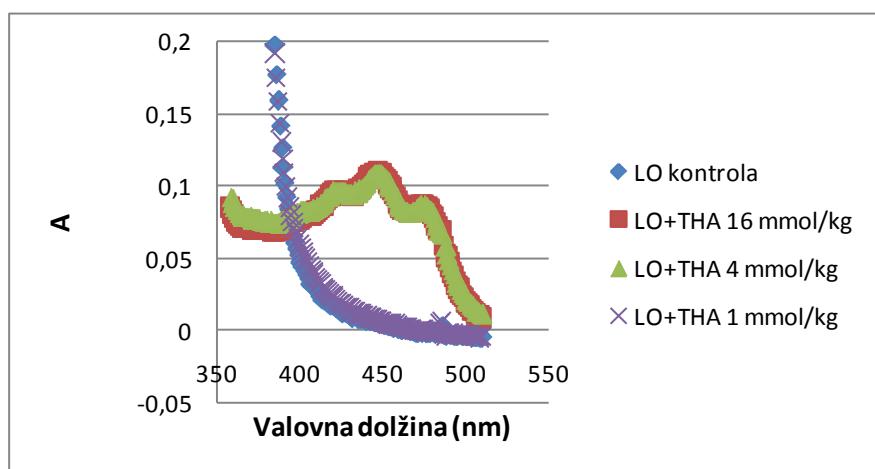
Slika 22: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 3. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA).



Slika 23: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 3. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA).



Slika 24: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 5. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA).



Slika 25: Karotenoidi v lanenem olju (LO) po inkubaciji na 60 °C pri dnevu 5. Olju so bile dodane različne koncentracije triheksilamina (THA).

4.1.3 Rezultati meritev kemijskih analiz vzorcev rafiniranega sončničnega olja

V okviru poskusa smo analizirali vpliv γ -tokoferola in različnih koncentracij heksilamina na potek oksidacije v rafiniranem sončničnem olju, ki je bogato z α -tokoferolom. Poizkus smo izvedli zato, ker smo na osnovi predhodnih analiz ugotovili, da imajo amini večji vpliv na potek oksidacije v lanenem olju (vsebuje γ -tokoferol) kot v sončničnem olju. Največji dodatek baze v mešanico olje je bil 32 mmol/kg. Olja z γ -T in z različno vsebnostjo HA smo inkubirali na 60 °C. V ustreznih časovnih intervalih smo vzorčili oksidirana olja in v njih določali vsebnost peroksidov.

4.1.3.1 Peroksidi

Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelaričnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 5. Rezultati so prikazani v obliki grafa na sliki 26.

Dan 1: V kontrolnem vzorcu smo po dnevu 1 določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost peroksidov v sončničnem olju je bila 10 mmol/kg. Dodatek γ -tokoferola in heksilamina je zavrl peroksidacijo lipidov v olju, saj je bila v vseh vzorcih vsebnost izmerjenih peroksidov manjša, kot pri kontrolnem vzorcu. Pri dodatku kombinacije γ -tokoferola in heksilamina smo določili celo zmanjšano vsebnost le teh, kar lahko pripišemo razgradnji peroksidov, ki so bili že na začetku prisotni v olju.

Dan 3: Po treh dneh inkubacije smo v kontrolnem vzorcu določili povečano vsebnost peroksidov. V sončničnem olju se je vsebnost le-teh povečala za 7,5x v primerjavi z dnevom 0. Dodatek kombinacije γ -tokoferola in heksilamina je imel dober učinek na zmanjšanje vsebnosti peroksidov v vzorcih. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom γ -tokoferola in heksilamina po dnevu 3 je bila pri sončničnem olju, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 3x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri dodatku γ -tokoferola in srednje koncentracije heksilamina je zanašala vsebnost peroksidov 56 % kontrolnega vzorca. Pri dodatku γ -tokoferola in najnižje koncentracije heksilamina je zanašala vsebnost peroksidov 65% kontrolnega vzorca. Dodatek samega γ -tokoferola je malo vplival na upočasnitev peroksidacije. Vsebnost peroksidov je bila v tem primeru 83 % kontrolnega vzorca.

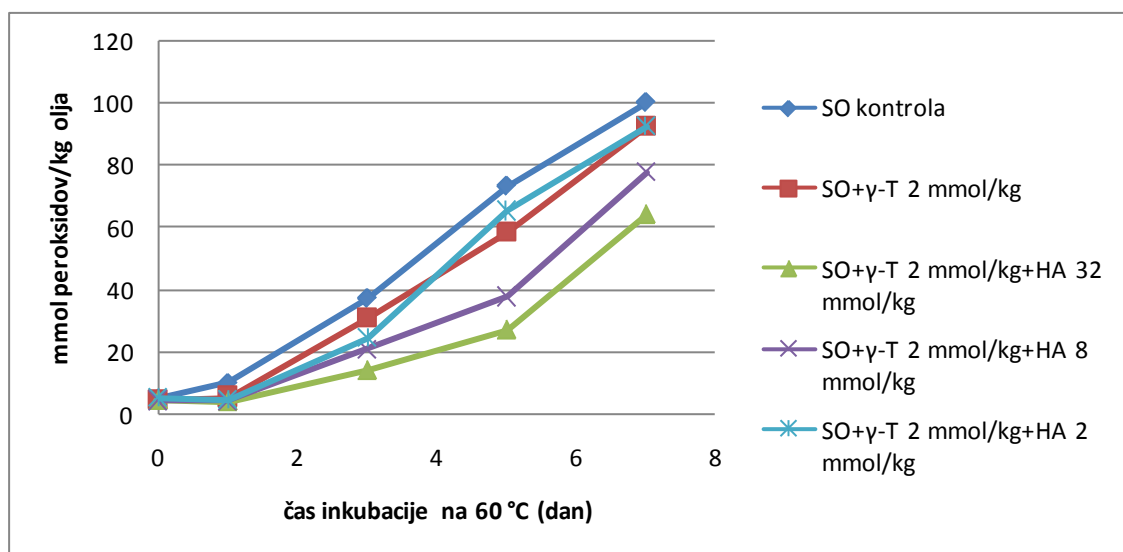
Dan 5: Po petih dneh inkubacije smo v kontrolnih vzorcih zaznali še večje vsebnosti peroksidov kot po dnevu 3. V sončničnem olju se je vsebnost le-teh povečala za 15x v primerjavi z dnevom 0. Dodatek kombinacije γ -tokoferola in heksilamina je imel, podobno, kot pri dnevu 3, pozitiven učinek na zaviranje nastanka peroksidov v vzorcih. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom γ -tokoferola in heksilamina po dnevu 5 je bila pri sončničnem olju, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 3x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po petih dneh inkubacije. Pri dodatku γ -tokoferola in srednje koncentracije heksilamina je zanašala vsebnost peroksidov 52 %

kontrolnega vzorca. Pri dodatku γ -tokoferola in najnižje koncentracije heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 89 % kontrolnega vzorca.

Dodatek samega γ -tokoferola je zopet le malo vplival na upočasnitev peroksidacije. Vsebnost peroksidov je znašala v tem primeru 80 % kontrolnega vzorca.

Dan 7: Po sedmih dneh inkubacije v sončničnem olju se je vsebnost peroksidov povečala za 20x v primerjavi z dnevom 0. Dodatek kombinacije γ -tokoferola in najvišje ter srednje heksilamina je imel še vedno dober učinek na zmanjšanje vsebnosti peroksidov v vzorcih, vendar vseeno nekoliko slabšega kot prejšnje dni. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom γ -tokoferola in heksilamina po dnevu 7 je bila pri sončničnem olju, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 1,5x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec petih dneh inkubacije. Pri dodatku γ -tokoferola in srednje koncentracije heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 78 % kontrolnega vzorca. Pri dodatku γ -tokoferola in najnižje koncentracije heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 92 % kontrolnega vzorca.

Dodatek samega γ -tokoferola je zopet le malo vplival na upočasnitev peroksidacije. Učinek je bil podoben kot ob dodatku γ -tokoferola in najnižje koncentracije heksilamina, saj je znašala vsebnost peroksidov tudi v tem primeru 92 % kontrolnega vzorca.



Slika 26: Vsebnost peroksidov v rafiniranem sončničnem olju (SO) po inkubaciji na 60 °C. Olju je bil dodan γ -tokoferol (γ -T) in različne koncentracije heksilamina (HA).

Rezultati kažejo na to, da je dodatek samega γ -tokoferola v sončnično olje občutno zmanjšal hitrost peroksidacije (kot delež prirasta peroksidov glede na kontrolo) le v začetni fazi (dan 1). Učinek pri daljših časih inkubacije je manjši. Pričakovali smo, da bo dodatek γ -tokoferola bolj vplival na zmanjšano nastajanje peroksidov ves čas inkubacije.

Iz slike 26 je mogoče videti, da je bila izmerjena vsebnost peroksidov ves čas inkubacije najnižja ob dodatku kombinacije γ -T in HA (predvsem pri dodatku najvišje koncentracije

HA). Čeprav v eksperimentu, prikazanem na sliki 26, niso bile dodane enake koncentracije HA kot v čisto sončnično olje (brez γ -tokoferola, slika 19), lahko trdimo da dodatek γ -tokoferola ni bistveno vplival na zmanjšanje oksidacije olja v prisotnosti HA. Mehanizem delovanja uporabljene baze ni popolnoma jasen, zato je težko reči ali je upočasnitev oksidacijskih procesov posledica delovanja samega heksilamina kot antioksidanta ali gre za to, da baza heksilamin deluje sinergistično s tokoferoli.

4.1.4 Rezultati kemijskih analiz vzorcev rafiniranega koruznega olja

V okviru osnovnega poskusa smo analizirali vpliv različnih koncentracij triheksilamina in heksilamina na potek oksidacije v rafiniranem koruznem olju. Rafinirano koruzno olje vsebuje vse vrste tokoferolov, med njimi vsebuje največ γ -tokoferola in α -tokoferola (Preglednica 5). Največji dodatek baze v koruzno olje je bil 16 mmol/kg. Olje z različno vsebnostjo THA in HA smo inkubirali na 60 °C. V ustreznih časovnih intervalih smo vzorčili oksidirana olja in v njih določali vsebnost peroksidov.

4.1.4.1 Peroksidi

Pri dnevu 0 je bila izmerjena vsebnost peroksidov v kontrolnem vzorcu koruznega olja 1,4 mmol peroksidov/kg olja. Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelaričnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 6. Rezultati so prikazani v obliki grafa na sliki 27.

Dan 1: V kontrolnem vzorcu smo po dnevu 1 določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost peroksidov v koruznem olju je bila 2,2 mmol/kg. Dodatek triheksilamina in heksilamina je zavrl peroksidacijo lipidov v vseh vzorcih olja.

Dan 3: Po treh dneh inkubacije smo v kontrolnem vzorcu določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost peroksidov v koruznem olju je bila 14,5 mmol/kg. Vsebnost le-teh povečala za 10x v primerjavi z dnevom 0. Triheksilamin je imel velik vpliv na potek oksidacije. Vsebnost peroksidov je bila v koruznem olju in pri največji koncentraciji triheksilamina celo manjša kot ob dnevu 0. V olju z največjim dodatkom triheksilamina smo določili 79 % začetne vsebnosti peroksidov, kar je 13x manj kot v kontrolnem vzorcu za dan 3. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 29 % kontrolnega vzorca.

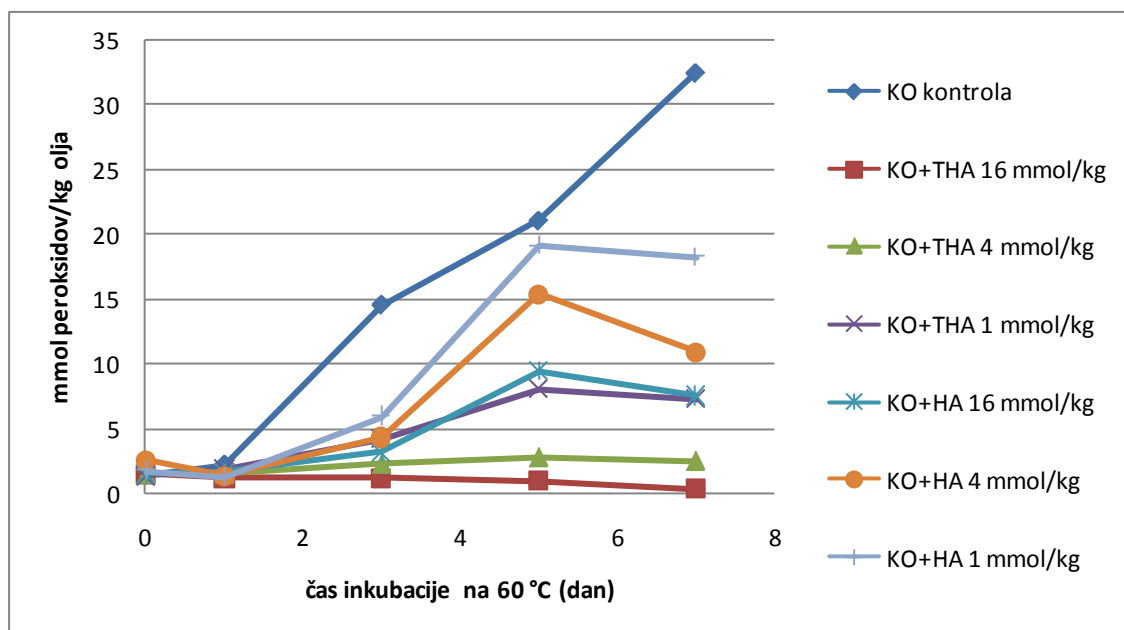
Tudi heksilamin je imel vpliv na potek oksidacije, vendar slabšega kot triheksilamin, tako kot smo predhodno že ugotovili za laneno in sončnično olje. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom heksilamina po dnevu 3 je bila, ko smo za največji dodatek heksilamina določili za $\approx 5x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 41 % kontrolnega vzorca.

Dan 5: Po petih dneh inkubacije smo v kontrolnem vzorcu določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost le-teh povečala za 15x v primerjavi z dnevom 0. Pokazal se je izjemen učinek triheksilamina na potek oksidacije. Vsebnost peroksidov je bila v koruznem olju in pri največji koncentraciji triheksilamina manjša kot ob dnevu 0 in 3. V olju z največjim dodatkom triheksilamina smo določili 65 % začetne vsebnosti peroksidov. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom triheksilamina po dnevu 5 je bila, ko smo za največji dodatek triheksilamina določili za $\approx 25x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po treh dneh inkubacije. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina (1 mM) je znašala vsebnost peroksidov 38 % kontrolnega vzorca.

Tudi heksilamin je imel vpliv na potek oksidacije, vendar slabšega kot triheksilamin, podobno kot pri dnevu 3. Največja razlika med kontrolnim vzorcem in dodatkom heksilamina po dnevu 5 je bila pri, ko smo za največji dodatek heksilamina določili ≈ 50 % koncentracije peroksidov v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri najnižji koncentraciji heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 91 % kontrolnega vzorca.

Dan 7: Po sedmih dneh inkubacije smo v kontrolnem vzorcu določili povečano vsebnost peroksidov. Vsebnost le-teh povečala za 23x v primerjavi z dnevom 0. Zopet se je pokazal izjemen učinek triheksilamina na potek oksidacije. Vsebnost peroksidov je bila v koruznem olju in pri največji koncentraciji triheksilamina najmanjša od vseh meritev, saj smo določili samo 23 % začetne vsebnosti peroksidov, oziroma $\approx 100x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po sedmih dneh. Pri srednji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 8 % kontrolnega vzorca. Pri najnižji koncentraciji triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 23 % kontrolnega vzorca.

Pri najvišji koncentraciji heksilamina smo določili za $\approx 4x$ manjšo koncentracijo kot za kontrolni vzorec po sedmih dneh inkubacije. Pri srednji koncentraciji heksilamina je znašala vsebnost peroksidov 34 % kontrolnega vzorca, in pri najnižji 56 % kontrolnega vzorca, kar je navidez bolje kot pri dnevu 5. Toda, ker so koncentracije peroksidov za omenjena dodatka po dnevu 7 manjše kot po dnevu 5, je manjša koncentracija najverjetneje posledica pospešene razgradnje in ne upočasnjene oksidacije.



Slika 27: Vsebnost peroksidov v rafiniranem koruznem olju (KO) po inkubaciji na 60 °C. Olju so bile dodane različne koncentracije heksilamina (HA) in triheksilamina (THA).

Koruzno olje, ki je bogato z γ -tokoferolom, se je manj oksidiralo kot npr. sončnično olje, ki ima primerljivo vsebnost večkrat nenasičenih maščobnih kislin, vendar vsebuje več α -tokoferola kot γ -tokoferola. Čeprav je težko oceniti antioksidativno aktivnost tokoferolov in tokotrienolov, ima α -tokoferol kljub najvišji biološki aktivnosti, najnižjo antioksidativno aktivnost (Belitz in Grosch, 2004). γ -tokoferol pa naj bi imel po navedbah Theriaulta in sod., 1999 najvišjo antioksidativno aktivnost. Večjo stabilnost koruznega olja in večji učinek γ -tokoferola kot antioksidanta bi lahko v tem primeru morda lahko pripisali temu, da je γ -tokoferol bolj stabilen tudi pri višjih temperaturah, kot pa α -tokoferol (Rudan-Tasič, 2000). Prav tako Yoshida in sod. po dognanjih večih raziskovalcev navajajo, da lahko v določenih okoliščinah aktivnost γ -tokoferola kot antioksidanta preseže aktivnost α -tokoferola, ki ima sicer najvišjo biološko aktivnost kot antioksidant (Yoshida in sod., 2003).

Rezultati kažejo na to, da dodatek baz heksilamina in triheksilamina, podobno kot pri poskusu z lanenim in sončničnim oljem pozitivno vpliva na upočasnitev oksidacijskih procesov in posledično na zmanjšanje vsebnosti peroksidov pri koruznem olju. Za bolj učinkovitega se je izkazal triheksilamin, podobno kot pri poskusu s sončničnim in lanenim oljem.

4.1.5 Rezultati kemijskih analiz vzorcev modelnega lipidnega sistema 1

V okviru poskusa smo analizirali vpliv triheksilamina v prisotnosti in odsotnosti α -tokoferola na potek oksidacije v modelnem lipidnem sistemu, ki je vseboval metil-linolenat. Vzorce smo inkubirali na 60 °C in v ustreznih časovnih intervalih določali

vsebnost peroksidov. Z modelnim lipidnim sistemom smo želeli pridobiti informacije o tem, ali triheksilamin deluje kot antioksidant tudi v odsotnosti tokoferolov.

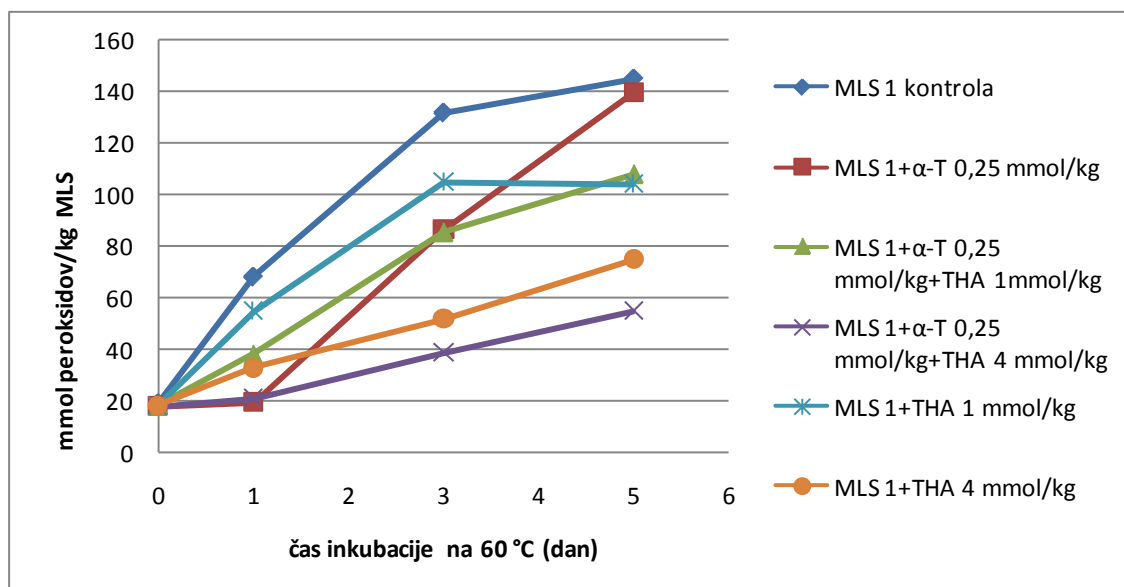
4.1.5.1 Analiza vpliva triheksilamina v kombinaciji z α -tokoferolom na tvorbo peroksidov v modelnem lipidnem sistemu

Pri dnevu 0 je bila izmerjena vsebnost peroksidov pri kontrolnih vzorcih MLS 1 19,2 mmol peroksidov/kg olja. To je relativno visoka vrednost in kaže na občutno oksidacijo komercialno dostopnega metil-linoleanta, kljub temu, da smo uporabili popolnoma svežo kemikalijo. Dodatek α -tokoferola in triheksilamina ni značilno vplival na določeno vsebnost peroksidov ob dnevu 0. Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelarnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 7. Rezultati so prikazani v obliki grafa na sliki 28.

Dan 1: V kontrolnem vzorcu smo po dnevu 1 določili 68,2 mmol/kg peroksidov. Dodatek α -tokoferola v kombinaciji triheksilaminom je popolnoma zavrl peroksidacijo, saj praktično ni prišlo do povečanja koncentracije peroksidov v primerjavi z dnevom 0. Iz rezultatov predstavljenih na sliki 28 je razvidno, da je vsebnost peroksidov v kombinaciji α -tokoferola in nizke koncentracije triheksilamina večja kot če je bil dodan samo α -tokoferol, kar si lahko razlagamo kot prooksidativen učinek triheksilamina v prisotnosti α -tokoferola. Tako 1 mM kot 4 mM triheksilamin v odsotnosti α -tokoferola sta rezultirala v manjši peroksidaciji. Antioksidativni učinek je bil koncentracijsko odvisen, saj smo pri večji koncentraciji določili manj peroksidov.

Dan 3: Po treh dneh inkubacije smo v kontrolnem vzorcu določili povečano vsebnost peroksidov, za 7x v primerjavi z dnevom 0. Najnižjo vsebnost smo določili pri kombinaciji α -tokoferola in visoke koncentracije triheksilamina, ki je rezultirala v $\approx 3x$ manjši koncentraciji peroksidov kot v kontrolnem vzorcu. Pri dodatku α -tokoferola in nizke koncentracije triheksilamina je znašala vsebnost peroksidov 65 % kontrolnega vzorca, kar je primerljivo z dodatkom samega α -tokoferola. V prisotnosti 4 mM triheksilamina smo določili manj peroksidov kot ob dodatku 0,25 mM α -tokoferola ter tako nismo ugotovili prooksidativnega učinka triheksilamina v kombinaciji α -tokoferolom.

Dan 5: Po petih dneh inkubacije smo v kontrolnem vzorcu in vzorcu z dodanim α -tokoferolom določili za 7,5x večjo vsebnost peroksidov kot ob dnevu nič. Velik porast peroksidov od dneva 1 do dneva 5 v vzorcu, kateremu je bil dodan α -tokoferol, bi lahko pripisali oksidaciji in razgradnji α -tokoferola. Primerjava vzorcev z dodanim 4 mM triheksilaminom v odsotnosti in prisotnosti α -tokoferola razkrije, da je dodatek α -tokoferola vplival le na meritev ob dnevu 1, medtem ko je prirast peroksidov od dneva 1 do dneva 5 praktično enak v obeh vzorcih.



Slika 28: Vsebnost peroksidov v modelnem lipidnem sistemu 1 (MLS 1) po inkubaciji na 60 °C. Modelnemu lipidnemu sistemu je bil dodan α -tokoferol (α -T) in različne koncentracije triheksilamina (THA).

Rezultati kažejo na to, da ima dodatek samega α -tokoferola pozitiven vpliv na začetno upočasnitev oksidacijskih procesov v modelnem lipidnem sistemu, vendar samo v določenem časovnem okviru (3 dni). Kot najučinkovitejša sta se za upočasnitev peroksidacije izkazala dodatka najvišje koncentracije triheksilamina in kombinacija α -tokoferola in najvišje koncentracije triheksilamina. Ti rezultati nakazujejo na to, da α -tokoferol in triheksilamin na nek način delujeta sinergistično, saj se je vsebnost peroksidov najbolj zmanjšala ravno ob dodatku te kombinacije. S tem poskusom smo potrdili, da dodatek baz pozitivno vpliva na upočasnitev oksidacijskih procesov tudi v modelnem lipidnem sistemu.

4.1.6 Rezultati kemijskih analiz vzorcev modelnega lipidnega sistema 2

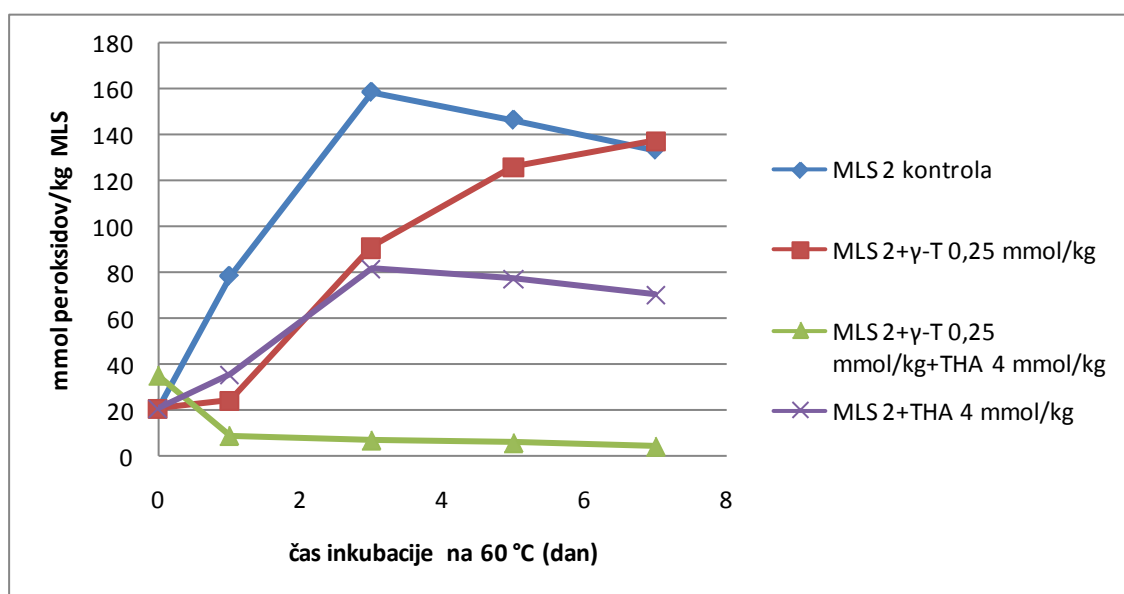
V okviru poskusa smo analizirali vpliv α -tokoferola, γ -tokoferola, triheksilamina, heksilamina in izbranih kombinacij na potek oksidacije v modelnem lipidnem sistemu. Vzorce smo inkubirali na 60 °C in v ustreznih časovnih intervalih vzorčili oksidirani modelni lipidni sistem in v njem določali vsebnost peroksidov.

4.1.6.1 Analiza vpliva triheksilamina v kombinaciji z γ -tokoferolom na tvorbo peroksidov v modelnem lipidnem sistemu

Na sliki 29 so predstavljeni rezultati za analizo vpliva triheksilamina na oksidacijo modelnega lipidnega sistema v prisotnosti in odsotnosti γ -tokoferola, saj smo v okviru MLS 1 analizirali le vpliv triheksilamina na tvorbo peroksidov v prisotnosti α -tokoferola.

Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelaričnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 8.

γ -tokoferol (slika 29) je podobno kot α -tokoferol (slika 28) upočasnil potek oksidacije v modelnem lipidnem sistemu. Izmerjena vsebnost peroksidov po enem, oziroma treh dneh inkubacije v kontrolnem vzorcu je bila večja kot pri MLS 1, čeprav smo imeli enako začetno sestavo kontrolne raztopine. Manjše razlike bi lahko pripisali večji začetni vsebnosti peroksidov v kontrolnem vzorcu. Sam triheksilamin je učinkoval kot antioksidant, vendar je bil tudi inhibitorski učinek manjši kot v MLS1 pri enaki začetni koncentraciji. Mešanica triheksilamin/ γ -tokoferol (slika 29) se je izkazala za precej bolj učinkovito od mešanice triheksilamin/ α -tokoferol (slika 28). V kombinaciji triheksilamin/ γ -tokoferol, se je vsebnost peroksidov skozi celotno inkubacijo zmanjševala. Opazen je izrazit sinergistični učinek, ki ga nismo zaznali v kombinaciji triheksilamin/ α -tokoferol.



Slika 29: Vsebnost peroksidov v modelnem lipidnem sistemu 2 (MLS 2) po inkubaciji na 60 °C. Modelnemu lipidnemu sistemu je bil dodan γ -tokoferol (γ -T) in triheksilamin (THA).

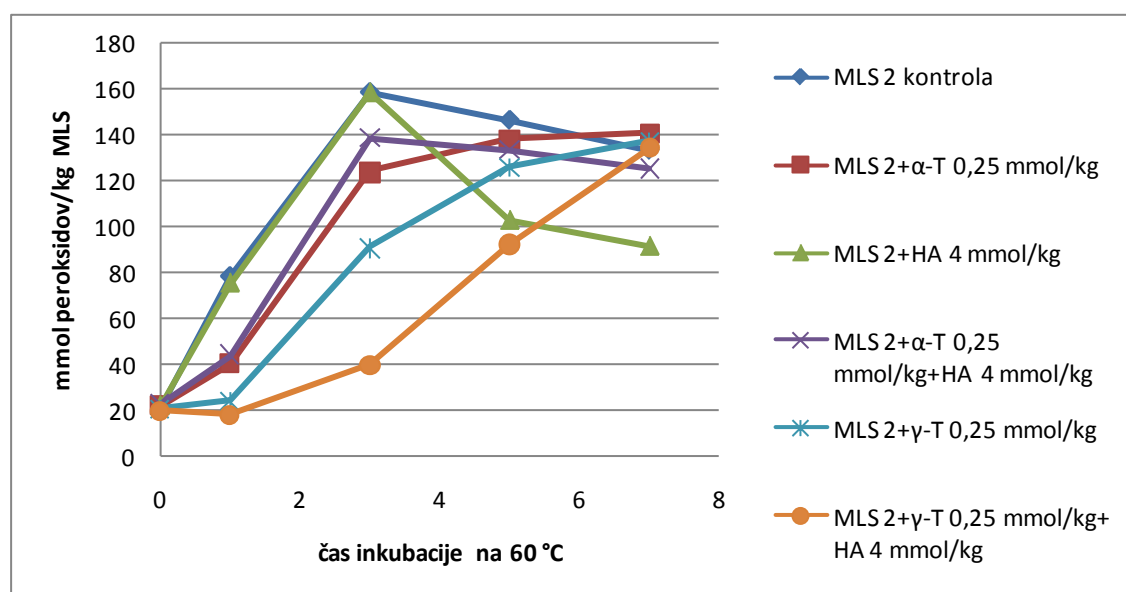
4.1.6.2 Analiza vpliva heksilamina v kombinaciji z α -tokoferolom in γ -tokoferolom na tvorbo peroksidov v modelnem lipidnem sistemu

Podatki o določeni vsebnosti peroksidov so v obliki tabelaričnih vrednosti predstavljeni v prilogi A 8.

Podobno kot za triheksilamin smo tudi za heksilamin analizirali kako le-ta vpliva na potek oksidacije v prisotnosti α -tokoferolain γ -tokoferola. Iz rezultatov predstavljenih na sliki 30

je razvidno, da sam heksilamin ne vpliva na potek oksidacije v odsotnosti tokoferolov, saj so peroksidna števila po dnevih 1 in 3 praktično enaka kot v kontrolnem vzorcu. Za dan 5 in 7 smo določili manjša peroksidna števila v prisotnosti heksilamina v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Primerjava vpliva α - tokoferola in γ -tokoferola na potek oksidacije razkrije, da je slednji bolj učinkovit pri enaki molarni koncentraciji, saj smo v vseh časovnih intervalih določili manjšo koncentracijo peroksidov. Dodatek heksilamina v kombinaciji z α - tokoferolom in γ -tokoferolom je imel nasproten vpliv. Pri α - tokoferolu smo ugotovili, da dodatek heksilamina celo pospeši oksidacijo, saj smo po dnevu 1 in 3 določili nekaj večjo vsebnost peroksidov. Po dnevih 5 in 7 je v kombinaciji heksilamin/ α -tokoferol vsebnost peroksidov manjša kot, če je bil dodan samo α - tokoferol, kar ponovno lahko razložimo s pospešeno razgradnjo peroksidov v prisotnosti baz, ko novi peroksidi ne morejo več nastajati, saj se je vsa linolenska kislina že oksidirala.

Za kombinacijo heksilamin/ γ - tokoferol pa lahko ugotovimo izrazit sinergistični učinek, podobno kot to velja za kombinacijo triheksilamin/ γ - tokoferol. Nedvomno lahko trdimo, da heksilamin po treh in petih dneh potencira učinek γ - tokoferola, saj sam ne vpliva na potek peroksidacije. Rezultati modelnih sistemov se skladajo s tistimi, ki smo jih pridobili za olja, saj sta tako triheksilamin kot heksilamin bolj učinkovita v lanenem olju kot v sončničnem olju (sliki 18 in 19)



Slika 30: Vsebnost peroksidov v modelnem lipidnem sistemu 2 (MLS 2) po inkubaciji na 60 °C. Modelnemu lipidnemu sistemu so bili dodani γ -tokoferol (γ -T), α -tokoferol (α -T) in heksilamin (HA).

5 SKLEPI

- Maščobnokislinska sestava olja vpliva na hitrost oksidacije. Laneno olje, ki je bogato z linolensko kislino se hitreje oksidira kot koruzno in sončnično olje, ki sta bogata z linolno kislino.
- Baze, kot sta heksilamin in triheksilamin vplivajo na potek oksidacije v različnih rastlinskih oljih in modelnih lipidnih sistemih. Dodatek nepolarnih baz učinkovito zmanjšuje primarne in sekundarne produkte lipidne peroksidacije v rastlinskih oljih.
- Prosta palmitinska kislina ne vpliva značilno na potek oksidacije v oljih.
- Antioksidativna učinkovitost baz je koncentracijsko odvisna. Višje koncentracije dodanih baz učinkoviteje zavirajo oksidacijo.
- Triheksilamin deluje kot antioksidant tudi v odsotnosti tokoferolov, medtem ko heksilamin ne deluje kot antioksidant v odsotnosti tokoferolov.
- Obe nepolarni bazi delujeta sinergistično v kombinaciji z γ -tokoferolom, medtem ko v kombinaciji z α -tokoferolom sinergističnega učinka nismo ugotovili.

6 POVZETEK

Osnovni namen magistrske naloge je bil preveriti vpliv kislin in baz na tvorbo primarnih in sekundarnih produktov oksidacije v rastlinskih oljih in modelnih lipidnih sistemih. Zanimala nas je koncentracijska odvisnost učinkovitosti uporabljenih aminov kot antioksidantov, prav tako pa smo želeli ugotoviti, ali amini sinergistično delujejo z γ -tokoferolom in α -tokoferolom, ki sta najpomembnejša antioksidanta v rastlinskih oljih.

V magistrskem delu smo spremljali oksidacijo v mešanicah lanenega olja in rafiniranega oljčnega olja (50 % lan-50 % oljka; 10 % lan-90 % oljka), v lanenem olju, rafiniranih sončničnem olju in koruznem olju. Na koncu smo preverili potek oksidacije še v modelnih lipidnih sistemih. Oljem in lipidnim sistemom smo dodajali palmitinsko kislino, bazi heksilamin in triheksilamin ter α - in γ -tokoferol v različnih koncentracijah.

Vzorci smo inkubirali v temi na 60 °C, v časovnem obdobju 5 ali 7 dni. V ustreznih časovnih intervalih smo vzorcem določali primarne (peroksidno število, konjugirani dieni) in sekundarne oksidacijske produkte (p-anizidinsko število, konjugirani trieni). V lanenem olju smo spremljali tudi razgradnjo karotenoidov med inkubacijo v temi na 60 °C.

Na začetku naloge smo predpostavili tri hipoteze in sicer:

- da bodo amini upočasnili oksidacijo lipidov rastlinskih oljih in modelnih lipidnih sistemih,
- da bo prosta palmitinska kislina pospešila oksidacijo lipidov v rastlinskih oljih,
- da bomo ugotovili sinergistično delovanje med amini in tokoferoli.

Na temo delovanja aminov kot antioksidantov je bilo narejenih že več študij in nekateri amini se že dolgo uporabljajo kot antioksidanti v lipidnih sistemih. Mehanizem delovanja aminov kot antioksidantov ni popolnoma razjasnjen, vendar po mnenju raziskovalcev amini reagirajo z oksidiranimi lipidi in delujejo kot antioksidanti zaradi svoje dušikove (amino) skupine. Ta deluje kot lovilce prostih radikalov in kot kelator kovinskih ionov (Toro-Funes in sod., 2013). Prvo hipotezo smo potrdili z vsemi eksperimenti na rastlinskih oljih. Uporabili smo bazi heksilamin in triheksilamin, ki smo ju oljem in lipidnim sistemom dodajali v različnih koncentracijah in v različnih kombinacijah z α - in γ -tokoferolom. Rezultati naših eksperimentov so pokazali, da sta bazi heksilamin in triheksilamin vplivali na upočasnitev oksidacijskih procesov v vseh rastlinskih oljih. Lahko bi rekli, da imata bazi heksilamin in triheksilamin dokazan antioksidativni učinek, glede na domneven mehanizem delovanja pa bi jih lahko prištevali k primarnim antioksidantom. Za optimalno koncentracijo so se izkazale najvišje uporabljene koncentracije obeh baz. Triheksilamin se je izkazal za učinkovitejšega, saj so bile izmerjene vsebnosti peroksidov v vzorcih z dodanim triheksilaminom nižje kot v vzorcih z dodanim heksilaminom. Razlog za večjo učinkovitost triheksilamina je morda v njegovi strukturi, saj je terciarni amin. Prvo hipotezo smo nato preverili še v dveh modelnih lipidnih sistemih, kjer smo dobili

podobne rezultate. Antioksidativnega učinka aminov nismo ugotovili edino za heksilamin v odsotnosti tokoferolov.

Proste maščobne kisline pospešujejo oksidacijo triacilglicerola v rastlinskih oljih in delujejo kot prooksidanti (Chen in sod., 2011). Na temo vpliva prostih maščobnih kislin na potek oksidacije je bilo narejenih že več študij in rezultati teh študij kažejo na to, da dodatek prostih maščobnih kislin pospešuje oksidacijo lipidov. Drugo hipotezo smo ovrgli s prvim eksperimentom, saj dodatek palmitinske kisline ni značilno vplival na določeno vsebnost peroksidov v mešanicah lanenega in rafiniranega oljčnega olja. Proste maščobne kisline so bolj dovzetne za oksidacijo kot zaestrene maščobne kisline, vendar je palmitinska kislina nasičena tako, da se sama ni oksidirala.

O sinergističnem delovanju baz z naravno prisotnimi tokoferoli ne obstaja veliko znanstvenih podatkov. Predvidevali smo, da bomo ugotovili sinergistično delovanje dodanih baz z naravno prisotnimi tokoferoli. Največji učinek dodane baze smo ugotovili v lanenem olju, bogatem z naravno prisotnim γ -tokoferolom. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je baza potencirala učinek naravno prisotnega antioksidanta.

Tretjo hipotezo smo potrdili samo za γ -tokoferol. V modelnih lipidnih sistemih smo pokazali, da tako heksilamin kot triheksilamin delujeta sinergistično z γ -tokoferolom. Pri α -tokoferolu sinergističnih učinkov nismo zaznali. Heksilamin je v prisotnosti α -tokoferola pokazal tudi manjši prooksidativni učinek. Eksperimenti v modelnih sistemih, ki kažejo na večji učinek baz v prisotnosti γ -tokoferola, se skladajo z rezultati v rastlinskih oljih, ko smo največjo učinkovitost aminov ugotovili v lanenem olju, kjer je γ -tokoferol najpomembnejši antioksidant.

7 VIRI

- Aladedunye F., Catel Y., Przybylski R. 2012. Novel caffeic acid amide antioxidants: Synthesis, radical scavenging activity and performance under storage and frying conditions. *Food Chemistry*, 130: 945-952
- Aladedunye F., Przybylski R. 2013. Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food Chemistry*, 141: 2373-2378
- Alaiz M., Barragan S. 1995. Reaction of a lysyl residue analogue with (E)-2-octenal. *Chemistry and Physics of Lipids*, 75: 43-49
- Alaiz M., Zamora R., Hidalgo F. J. 1996. Contribution of the formation of oxidized lipid/amino acid reaction products to the protective role of amino acid in oils and fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44,7: 1890-1895
- Atkins P. W., Clugston M. J., Frazer M. J., Jones R. A. Y. 1998. *Kemija-zakonnosti in uporaba*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 460-462.
- Auborg S. P. 2001. Effect of partially hydrolysed lipids on inhibition of oxidation of marine lipids. *European Food Research and Technology*, 212: 540-545
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. 2004. *Food chemistry*. 3rd ed. Berlin, Springer: 409-426
- Błaszczak A., Augustyniak A., Skolimowski J. 2013. Ethoxyquin: An antioxidant used in animal feed. *International Journal of Food Science*, 2013: ID 585931, doi: 10.1155/2013/585931: 12 str.
- Boskou D. 2002. Olive oil. V: *Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses*. Gunstone F. D. (ed.). Boca Raton, CRC Press LLC: 244-275
- Boyer R. 2005. *Temelji biokemije*. Ljubljana, Študentska založba: 209-209
- Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense systems. V: *Natural antioxidants in human health and disease*. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 107-128
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2000. Tokoferoli in polifenoli v oljčnih oljih Slovenske Istre. V: *Antioksidanti v živilstvu*. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober

2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-91
- Chen B., McClements D. J., Decker E. A. 2011. Minor components in food oils: A critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oil and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 901-916
- Chien J. T., Huang D. Y., Chen B. H. 2004. Kinetic studies of cholesterol oxidation as inhibited by stearylamine during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7132-7138
- Choe E. 2008. Effects and mechanisms of minor compounds in oil on lipid oxidation. V: *Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology*. Akoh C. C., Min D. B. (eds.). 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 449-474
- Das K. C., Misra H. P. 2004. Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262: 127-133.
- Dauquan E. M. A., Sani H. A., Abdullah A., Kasim Z. M. 2011. Fatty acid composition of four different vegetable oils (red palm olein, corn oil and coconut oil) by gas chromatography. *IPCBEE*, 14: 31-34
- Dissociation constants of organic acids and bases. 2015. Madison, University of Wisconsin, Department of Chemistry: 18 str.
http://www.chem.wisc.edu/courses/116/OtherDoc/pKas_of_Organic_Acids_and_Bases.pdf (januar, 2015)
- Eskin N. A. M., Przybylski R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. V: *Food shelf life stability: Chemical, biochemical and microbiological changes*. Eskin N. A. M., Robinson D. S. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 186-191
- FAO. 2014. Specifications for flavourings: (online ed.): Hexylamine. Rome, Food and Agriculture Organization of the United States: 1 str.
<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-flav/details.html?flavId=4876> (december, 2014)
- FDA. 2014. Everything added to food in the United States (EAFUS). Silver Spring, Food and Drug Administration: 123 str.
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnavigation.cfm?rpt=eafuslisting&displayAll=true> (december, 2014)
- Gay C., Collins J., Gebicki J.M. 1998. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. *Analytical Biochemistry*, 273: 149-155

- Gorbatov V. M., Dmitrievich S. K., Krylova N. N., Lyaskovskaya J. N., Volovinskaya V. P.B., Ivanovna Solovieva K., Ivanovna Khlamova L., Igorevna R. 1975. Preparation for imparting smoke to meat products. United States Patent and Trademark Office 3,922,367: 5 str.
- Grootveld M., Silwood C. J. L., Addis P., Claxson A., Serra B. B., Viana M. 2001. Health effects of oxidized heated oils. *Foodservice Research International*, 13,1: 41-55
- Gunstone F. D. 1996. Fatty acid and lipid chemistry. 1st ed. London, Blackie Academic&Professional: 173-180
- Gupta M. K. 2002. Sunflower oil. V: *Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses*. Gunstone F. D. (ed.). Boca Raton, CRC Press LLC: 128-157
- Kahl R., Hildebrandt A. G. 1986. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 24,10-11: 1007-1014
- Kochhar S. P. 2002. Sesame, rice-bran and flaxseed oils. V: *Vegetable oils in food technology*. Gunstone F. D. (ed.). Boca Raton, CRC Press LLC: 318-322
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 15-15
- Kostik V., Memeti S., Bauer B. 2013. Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 4: 112-116
- Labrinea E. P., Thomaidis N. S., Georgiou C. A. 2001. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 448: 201-206
- Larsson N., Otremska P., Villar M., Jonsson J. A. 2011. Liquid phase micro-extraction of linear alkylbenzene sulfonate anionic surfactants in aqueous samples. *Membranes*, 1, 4: 299-313
- Merck Millipore. 2015. Merck Millipore product database: 804326 hexylamine. Darmstadt, Merck Millipore Corporation: 4 str.
http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Hexylamine,MDA_CHEM-804326
(januar, 2015)

- Morales M. T., Przybylski R. 2000. Olive oil oxidation. V: Handbook of olive oil: analysis and properties. Harwood J. in Aparicio R. (ed.). New York, Aspen Publisher Inc.: 459-461
- NCBI. 2015a. PubChem compound database: CID 14985 alpha-tocopherol. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 60 str.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Tocopherol> (februar, 2015)
- NCBI. 2015b. PubChem compound database: CID 92729 gamma-tocopherol. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 18 str.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Tocopherol#section=Top> (februar, 2015)
- NCBI. 2015c. PubChem compound database: CID 3293 ethoxyquin. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 29 str.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethoxyquin#section=Top> (februar, 2015)
- NCBI. 2015č. PubChem compound database: CID 1103 spermine. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 26 str.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/spermine#section=Top> (februar, 2015)
- NCBI. 2015d. PubChem compound database: CID 1102 spermidine. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 19 str.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1102?from=summary#section=2D-Structure> (februar, 2015)
- Paradiso V. M., Gomes T., Nasti R., Caponio F., Summo C. 2010. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. Food Research International, 43: 1389-1394
- Pfaltz&Bauer. 2015. Safety data sheet: T24355 Trihexylamine. Waterbury, Pfaltz&Bauer: 6 str.
<http://www.pfaltzbauer.com/MSDS/T24355%20%20SDS%20%2008162013.pdf> (julij, 2015)
- Raflowski R., Zegarska S., Kunciewicz A., Borejszo Z. 2008. Fatty acid composition, tocopherols and β -carotene content in polish commercial vegetable oils. Pakistan Journal of Nutrition, 7, 2: 278-282

- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioproceni pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 55-56
- Roman O., Heyd B., Broyart B., Castillo R., Maillard M. N. 2013. Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *LWT: Food Science and Technology*, 52: 49-59
- RSC. 2015a. ChemSpider compound database: ChemSpider ID 7811 hexylamine. London, Royal Society of Chemistry: 3 str.
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7811.html> (februar, 2015).
- RSC. 2015b. ChemSpider compound database: ChemSpider ID 59413 trihexylamine. London, Royal Society of Chemistry: 3 str.
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.59413.html> (februar, 2015).
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamini C, E in Q10. V: Antioksidanti v živilstvu. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 44-47
- Salunkhe D. K., Chavan J. K., Adsule R. N., Kadam S. S. 1992. *World seeds: Chemistry, technology and utilization*. New York, Van Nostrand Reinhold: 101-107
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.M. 2008. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 2: 152-161
- Shahidi F., Zhong Y. 2005. Lipid oxidation: Measurement methods. V: *Baileys industrial oil and fat products*. 6th ed. Shahidi F. (ed.). Canada, John Wiley and sons Inc.: 357-380
- Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: Antioksidanti v živilstvu. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-189
- Smith S. A., King R. E., Min D. B. 2007. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food Chemistry*, 102, 4: 1208-1213
- Taimr L. 1994. Study of the antioxidant action of ethoxyquin. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 217: 119-128

- Theriault A., Chao J. T., Wang Q., Gapor A., Adeli K. 1999. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry*, 32,5: 309-319
- Toro-Funes N., Bosch-Fuste J., Veciana-Nogues M. T., Izquierido-Pulido M., Vidal-Carou C. 2013. *In vitro* antioxidant activity of dietary polyamines. *Food Research International*, 51: 141-147
- Tsaknis J., Stavros L., Michael H., Gillian S., Vassiliki T. 1988. Rapid high performance liquid chromatographic method of determining malondialdehyde for evaluation of rancidity in edible oils. *Analyst*, 123: 325-327
- Turner R., McLean C. H., Silver K. M. 2006. Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation? *Nutrition Research Reviews*, 19: 53-62
- Yen G. C., Kao H. H. 1993. Antioxidative effect of biogenic amine on the peroxidation of linoleic acid. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 57, 1: 115-116
- Yi J., Zhu Z., Dong W., McClements D. J., Decker E. A. 2013. Influence of free fatty acids on oxidative stability in water-in-walnut oil emulsions. *European Journal of Lipid Science Technology*, 115: 1013-1020
- Yoshida H., Kondo I., Kajimoto G. 1992. Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 11: 1136-1140
- Yoshida Y., Nike E., Noguchi N. 2003. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 123, 1: 63-75
- Waraho T., McClements D. J., Decker E. A. 2011. Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 129: 854-859
- WHO. 2009. Flavouring agents. V: Evaluation of certain food additives. 69th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 2008. Geneva, WHO: 71-164
http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_952_eng.pdf (december, 2014)
- Wrolstad R. E., Decker E. A., Schwalz S. J., Sporns P. 2005. Lipid oxidation/stability. V: Handbook of analytical chemistry: water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates. Wrolstad R. E. (ed.). Hoboken, J. Wiley&Son: 513-564

Zelenik-Blatnik M. 1992. Kemične spremembe triacilglicerolov v živilih. V: Lipidi. 14. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 4. in 5. junij, 1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak Anamarija (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 20-25

Zuta P. C., Simpson B. K., Zhao X., Leclerc L. 2007. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. Food Chemistry, 100, 2: 800-807

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in usmerjanje pri nastajanju magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Blažu Cigiću. Posebna zahvala tudi za odzivnost, nasvete in podajanje znanja ter za vodenje pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Za strokoven pregled in popravke naloge se zahvaljujem somentorici doc. dr. Nataši Šegatin in recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu.

Zahvaljujem se tudi Tjaši Prevc za pomoč in nasvete pri izvedbi eksperimentalnega dela v laboratoriju. Zahvala gre tudi ostalim zaposlenim v laboratoriju na Katedri za biokemijo in kemijo.

Univ. dipl. inž. Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za pregled referenc in oblike magistrskega dela.

Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je študij omogočila in me tekom le-tega ves čas spodbujala in mi pomagala.

PRILOGE

Priloga A: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v različnih vzorcih olja in modelnih lipidnih sistemov

Priloga A1: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v mešanica z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	4	7
LOO kontrola	5,44	7,81	14,65	24,13
LOO+THA 40 mmol/kg	5,72	3,04	0,31	1,09
LOO+THA 12 mmol/kg	/	5,18	0,92	1,64
LOO+THA 4 mmol/kg	/	5,84	3,67	3,35
LOO+PK 40 mmol/kg	5,6	7,61	13,42	19,7
LOO+PK 12 mmol/kg	/	8,44	14,41	21,29
LOO+PK 4 mmol/kg	/	8,44	15,16	24,09

*Podatki označeni z /: nismo izvajali meritev vsebnosti peroksidov v vzorcih

Priloga A2: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v mešanica s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	4	7
LOO kontrola	3,55	10,55	123,59	293,64
LOO+THA 40 mmol/kg	3,44	2,36	0,21	0,76
LOO+THA 12 mmol/kg	/	3,21	1,15	1,61
LOO+THA 4 mmol/kg	/	4,85	2,83	3,92
LOO+PK 40 mmol/kg	3,48	8,22	43,1	307,48
LOO+PK 12 mmol/kg	/	9,42	65,48	190,24
LOO+PK 4 mmol/kg	/	10,15	94,3	303,69

*Podatki označeni z /: nismo izvajali meritev vsebnosti peroksidov v vzorcih

Priloga A3: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v lanenem olju (LO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	3	5	7
LO kontrola	1,82	7,12	181,94	400,63	330,57
LO+THA 16 mmol/kg	1,59	1,28	0,62	0,73	1,36
LO+THA 4 mmol/kg	1,68	2,35	2,13	1,84	2,46
LO+THA 1 mmol/kg	1,94	4,55	33,46	173,19	251,55
LO+HA 16 mmol/kg	1,8	2,26	3,73	39,04	114,43
LO+HA 4 mmol/kg	1,7	2,49	7,42	232,27	374,26
LO+HA 1 mmol/kg	1,8	2,77	37,67	363,67	362,09

Priloga A4: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v rafiniranem sončničnem olju (SO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	3	5	7
SO kontrola	2,34	9,15	32,02	53,23	66,67
SO+THA 16 mmol/kg	3,16	2,89	2,39	1,87	2,01
SO+THA 4 mmol/kg	2,95	7,38	8,02	7,42	9,08
SO+THA 1 mmol/kg	2,81	13,54	39,5	59,66	82,12
SO+HA 16 mmol/kg	2,89	3,98	10,08	26,1	43,94
SO+HA 4 mmol/kg	2,9	4,38	25,03	30,66	58,38
SO+HA 1 mmol/kg	2,72	5,59	31,85	47,68	73,04

Priloga A5: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v rafiniranem sončničnem olju (SO) z dodanim γ -T in različnimi koncentracijami HA po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	3	5	7
SO kontrola	5,03	10,01	37,48	73,66	100,58
SO+ γ -T 2 mmol/kg	4,61	5,41	30,94	58,87	92,8
SO+ γ -T 2 mmol/kg+HA 32 mmol/kg	4,45	4,05	14,1	27,2	64,51
SO+ γ -T 2 mmol/kg+HA 8 mmol/kg	4,41	4,21	20,95	37,99	78,02
SO+ γ -T 2 mmol/kg+HA 2 mmol/kg	5,04	4,58	24,46	65,43	92,66

Priloga A6: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v koruznem olju (KO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	3	5	7
KO kontrola	1,41	2,15	14,54	21,05	32,5
KO+THA 16 mmol/kg	1,46	1,13	1,11	0,91	0,33
KO+THA 4 mmol/kg	1,52	1,56	2,32	2,82	2,54
KO+THA 1 mmol/kg	1,35	1,88	4,22	8,09	7,33
KO+HA 16 mmol/kg	1,55	1,66	3,2	9,42	7,52
KO+HA 4 mmol/kg	2,62	1,39	4,35	15,37	10,89
KO+HA 1 mmol/kg	1,74	1,3	5,97	19,16	18,31

Priloga A7: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v modelnem lipidnem sistemu 1 (MLS 1) z dodanim α -T in različnimi koncentracijami THA po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	3	5
MLS 1 kontrola	19,18	68,17	131,65	144,78
MLS 1+ α -T 0,25 mmol/kg	18,01	19,66	86,49	139,76
MLS 1+ α -T 0,25 mmol/kg+THA 1 mmol/kg	18,29	38,01	85,33	107,84
MLS 1+ α -T 0,25 mmol/kg+THA 4 mmol/kg	17,85	20,87	38,94	55,03
MLS 1+THA 1 mmol/kg	18,41	55,12	105,03	104,3
MLS 1+THA 4 mmol/kg	18,2	32,74	52,03	74,98

Priloga A8: Vsebnost peroksidov (mmol/kg) v modelnem lipidnem sistemu 2 (MLS 2) z dodanim α -T, γ -T, THA in HA po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	1	3	5	7
MLS2 kontrola	20,88	78,5	158,43	146,32	133,32
MLS 2+ α -T 0,25 mmol/kg	21,99	40,07	123,92	138,19	140,8
MLS 2+ γ -T 0,25 mmol/kg	20,82	24,16	90,99	126,47	137,43
MLS 2+HA 4 mmol/kg	22,04	75,55	158,69	102,94	91,61
MLS 2+THA 4 mmol/kg	20,77	35,71	81,49	77,27	70,22
MLS 2+ α -T 0,25 mmol/kg+HA 4 mmol/kg	22,8	44,08	138,67	133,65	125,27
MLS 2+ γ -T 0,25mmol/kg+HA 4 mmol/kg	19,23	17,82	39,35	91,98	134,17
MLS 2+ γ -T 0,25 mmol/kg+THA 4 mmol/kg	34,89	8,69	6,7	5,54	3,99

Priloga B: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah lanenega in rafiniranega oljčnega olja

Priloga B1: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah z 10 % lanenega olja (LO) in 90 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	4
LOO kontrola	3,46	7,81
LOO+THA 40 mmol/kg	3,79	3,5
LOO+THA 12 mmol/kg	/	3,9
LOO+THA 4 mmol/kg	/	4,2
LOO+PK 40 mmol/kg	3,06	7,2
LOO+PK 12 mmol/kg	/	7,47
LOO+PK 4 mmol/kg	/	7,75

*Podatki označeni z /: nismo izvajali meritev p-AV v vzorcih

Priloga B2: Para-anizidinsko število (p-AV) v mešanicah s 50 % lanenega olja (LO) in 50 % rafiniranega oljčnega olja (OO) z dodanimi različnimi koncentracijami THA in PK po inkubaciji na 60 °C

Vzorec/Dan	0	4
LOO kontrola	2,33	55,85
LOO+THA 40 mmol/kg	2,31	2,32
LOO+THA 12 mmol/kg	/	2,82
LOO+THA 4 mmol/kg	/	3,55
LOO+PK 40 mmol/kg	2,7	18,61
LOO+PK 12 mmol/kg	/	24,7
LOO+PK 4 mmol/kg	/	39,35

*Podatki označeni z /: nismo izvajali meritev p-AV v vzorcih