



ZOTKS

Zveza za tehnično kulturo Slovenije

59. SREČANJE MLADIH RAZISKOVALCEV SLOVENIJE

Naslov raziskovalne naloge:

ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST HLADNO STISKANIH OLJ GROZDNIH PEŠK

Področje: Biologija



Avtorici:

Ana Hlebič, 8. a, OŠ Kungota

Zala Koletnik, 8. a, OŠ Kungota

Mentorica: Zdenka Keuc, prof., OŠ Kungota

Zg. Kungota, februar 2025

VSEBINA

1 UVOD	7
1.1 Opis problema	8
1.2 Cilji raziskave	8
1.3 Hipoteze	9
1.4 Metodologija	10
2 PREGLED OBJAV	10
2.1 Bioaktivne spojine v oljih grozdnih pešk	10
2.1.1 Antioksidanti v oljih grozdnih pešk	11
2.2 Hladno stiskana ekstra deviška oljčna olja	13
2.2.1 Antioksidanti v oljčnem olju in njihov vpliv na zdravje	14
2.3 Delovanje antioksidantiov	14
2.3.1 DPPH test	15
2.4 Identifikacija fenolnih spojin	15
2.4.1 Test Folin-Ciocalteu (F-C)	15
2.5 VIS Spektrofotometrija	16
2.6 Določitev kislinskega ali nevtralizacijskega števila	17
3 PRAKTIČNI DEL	17
3.1 Pridobivanje vzorcev in opis vzorcev ter standardov	17
3.2 Kemikalije in laboratorijski inventar, uporabljen v raziskavi	18
3.4 Opis vzorcev hladno stiskanih oljčnih oj	19
3.5 Priprava vzorcev olj	19
3.6 Določanje antioksidativne učinkovitosti olj	20
3.7 Določanje skupnih fenolnih spojin v hladno stiskanih oljih grozdnih pešk	21
3.7.1 Priprava umeritvene premice z galno kislino	21
3.7.2 Priprava vzorcev	22
4 MERITVE	23
4.1 Antioksidativna učinkovitost olj grozdnih pešk	23
4.1.1 Izračuni	25
4.2 Antioksidativna učinkovitost hladno stiskanih oljčnih olj	28
4.3 Antioksidativni potencial resveratrola	29
4.4 Vsebnost skupnih fenolnih spojin	31
4.4.1 Umeritvena premica za galno kislino	31
4.4.2 Vsebnost skupnih fenolov v vzorcih hladno stiskanih olj grozdnih pešk	32

4.5 Izračun korelacije med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AOP	33
4.6 Določitev kislinskega ali nevtralizacijskega števila.....	35
4.6.1 Rezultati meritev	35
4.6.2 Korelacija med vrednostjo skupnih fenolnih spojin in prostih maščobnih kislin.....	37
5 RAZPRAVA in ZAKLJUČKI	38
5.1 Omejitve raziskave in dopolnitve	39
7 VIRI.....	40

Kazalo slik

Slika 1. Suha semena grozdnih pešk (lasten vir).....	11
Slika 2. Strukturna formula linolne kisline (Dimić s sod., 2020).....	11
Slika 3. Epikatehin in kvercetin, pogosti fenolni spojini v OGP.....	12
Slika 4. Strukturna formula <i>cis</i> in <i>trans</i> – resveratrola in desno diariletana (Kaur s sod. , 2022).....	13
Slika 5. Oleinska kislina.....	13
Slika 6. Fenolne spojine v oljčnem olju (Ryan in sod., 2013).....	14
Slika 7. Mehanizem delovanja radikala DPPH (levo oksidirana oblika in desno reducirana oblika) (Sadeer s sod., 2020)	15
Slika 8. Kolorimeter, uporabljen v raziskavi (lasten vir)	23
Slika 9. Sprememba barve DPPH po 400 sekundah (sredinska kiveta in po 10 minutah (skrajno desna kiveta) (lasten vir)	25
Slika 11. F-C test (levo takoj po dodatku reagentov in desno po 5 min segrevanju na 50°C (lasten vir)	31
Slika 12. Vzorci pred titracijo (levo) in ob ekvivalentni točki (desno) (lasten vir).....	37

Kazalo grafov

Graf 1. Antioksidativna aktivnost hladno stisanih olj grozdnih pešk, izražena v mmol DPPH/kg olja	26
Graf 2. % inhibicije DPPH po 10 minutah.....	26
Graf 3. Antioksidativna aktivnost hladno stisanih oljčnih olj, izražena v mmol DPPH/kg olja	29
Graf 4. % inhibicije DPPH po 10 minutah.....	30
Graf 5. Primerjava uspešnosti inhibicije DPPH med oljčnimi olji in olji grozdnih pešk.....	30
Graf 6. AOP resveratrola v primerjavi z AOP hladno stisanih oljčnih olj ter hladno stisanih olj grozdnih pešk	31

Graf 7. Umeritvene premica za galno kislino.....	32
Graf 8. Koncentracija skupnih fenolnih spojin v vzorcih hladno stiskanih olj grozdnih pešk.....	32
Graf 9. Korelacija med % inhibicije DPPH in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za olja grozdnih pešk.....	34
Graf 10. Korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za olja grozdnih pešk in DPPH (mmol/kg olja).....	34
Graf 11. Korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in kislinskim številom hladno stiskanih OGP.....	37

Kazalo preglednic

Preglednica 1. Opisi preučevanih vzorcev hladno stiskanih olj iz grozdnih pešk.....	19
Preglednica 2. Opisi preučevanih vzorcev hladno stiskanih oljčnih olj.....	19
Preglednica 3. Koncentracija galne kisline za umeritveno premico.....	22
Preglednica 4. Sprememba absorbance za vzorec A.....	24
Preglednica 5. Sprememba absorbance za vzorec B.....	24
Preglednica 6. Sprememba absorbance za vzorec C.....	24
Preglednica 7. Sprememba absorbance za vzorec D.....	24
Preglednica 8. Sprememba absorbance za vzorec E.....	25
Preglednica 9. Izračun antioksidacijskega potenciala DPPH, izražen kot mmol DPPH/kg olja in antioksidacijskega potenciala AOP, izražen v odstotkih po 400 sekundah in 10. minutah.....	26
Preglednica 10. Sprememba absorbance za vzorec 1.....	28
Preglednica 11. Sprememba absorbance za vzorec 2.....	28
Preglednica 12. Sprememba absorbance za vzorec 3.....	28
Preglednica 13. Sprememba absorbance za vzorec 4.....	28
Preglednica 14. Sprememba absorbance za vzorec 5.....	29
Preglednica 15. Sprememba absorbance DPPH za resveratrol.....	29
Preglednica 16. Izračun antioksidativnega potenciala DPPH, izražen kot mmol DPPH/kg olja in antioksidativnega potenciala AOP, izražen v odstotkih po 400 sekundah.....	29
Preglednica 17. Podatki za umeritveno premico za galno kislino.....	31
Preglednica 18. Podatki za izračun skupnih fenolnih spojin v vzorcih hladno stiskanih.....	32
Preglednica 19. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v oljih grozdnih pešk.....	33
Preglednica 20. Pomen korelacijskega faktorja (Trček, 2022).....	34
Preglednica 21. Mase olj za titracijo.....	35
Preglednica 22. Titracija vzorca A.....	36
Preglednica 23. Titracija vzorca B.....	36
Preglednica 24. Titracija vzorca C.....	36

Preglednica 25. Titracija vzorca D	36
Preglednica 26. Titracija vzorca E	36
Preglednica 27. Izračun kislinskega števila.....	37

Kazalo organigramov

Organigram 1. Fenolne spojine v grozdju	12
Organigram 2. Shematični prikaz praktičnega dela	18

Uporaba kratic

Okrajšava	Polno ime	Okrajšava	Polno ime
OGP	Olje grozdnih pešk	H ₂ SO ₄	Žveplova(VI) kislina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	NaNO ₂	Natrijev nitrat(III)
F-C	Folin-Ciocalteujev reagent	Li ₂ SO ₄ ·4H ₂ O	litijev sulfat tetrahidrat
CO ₂	Ogljikov dioksid	HCl	klorovodikova kislina
AOU	Antioksidacijska učinkovitost	R-COOK	klijeva sol karboksilne kisline
OPC	Oligomerni proantocianidi	RF	referenčna vrednost
KOH	Kalijev hidroksid	V	vzorec
-OH	Hidroksilne skupine	SP	slepa proba
NaOH	Natrijev hidroksid	AOP	antioksidativni potencial
Na ₂ CO ₃	Dinatrijev karbonat(IV)	EGA	ekvivalent galne kisline
FeCl ₃	Železov triklorid	GA	galna kislina
		KŠ	kislinsko število (nevtralizacijsko število)
		MK	Maščobna kislina
		PP	polipropilen

POVZETEK

V raziskavi smo preučevali antioksidativno sposobnost hladno stiskanih oljčnih olj, letnik 2023, v primerjavi z antioksidativno sposobnostjo hladno stiskanih olj grozdnih pešk, letnik 2023 in ugotovili, da imajo olja grozdnih pešk za 30 % višjo antioksidativno učinkovitost, določeno s pomočjo DPPH radikala. Najvišjo izmerjeno antioksidativno učinkovitost je imela snov, ki smo jo uporabili kot standard, to je resveratrol (80 %), fenol, ki ga je največ v kožici grozdnih jagod. S pomočjo F-C metode smo določili vrednost skupnih fenolnih spojin v oljih grozdnih pešk. Te so se gibale 0,115 mg/g–0,340 mg/g olja. Korelacijski faktorji med sposobnostjo inhibicije radikala DPPH in skupno vrednostjo polifenolov v oljih so bili 0,74–0,90, kar pomeni (zelo) tesno povezanost obeh preučevanih dejavnikov. V oljih grozdnih pešk smo določili tudi vrednosti kislinskih števil, ki so se gibala od 0,20 % do 0,49 %. Korelacijski faktor med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in kislinskim številom je bil ponovno visok, 0,82, kar kaže na visoko stopnjo povezanosti. Trigliceridi, kjer so vezane maščobne kisline, so v veliki meri ostali stabilni in v letu dni (starost preučevanih olj) ni prišlo do njihove hidrolize ali oksidacije, kar nakazuje visoko kakovost preučevanih olj.

Ključne besede: hladno stiskana olja grozdnih pešk, antioksidativni potencial, skupni fenoli, kislinsko število.

ABSTRACT

In the study, the antioxidant capacity of cold-pressed olive oils from the 2023 harvest was compared to the antioxidant capacity of cold-pressed grape seed oils from the same year. It was found that grape seed oils exhibited 30% higher antioxidant efficiency, as determined by the DPPH radical assay. The highest measured antioxidant activity was observed in the compound used as the standard, resveratrol (80%), a phenol predominantly found in grape skins. The total phenolic content in grape seed oils was determined using the Folin-Ciocalteu (F-C) method, with values ranging from 0.115 mg/g to 0.340 mg/g of oil. Correlation coefficients between DPPH radical scavenging ability and total polyphenol content in the oils ranged from 0.74 to 0.90, indicating a (very) strong relationship between these two factors. Additionally, acid values in grape seed oils were measured, ranging from 0.20% to 0.49%. The correlation coefficient between total phenolic content and acid value was also high (0.82), demonstrating a strong connection between these parameters. Triglycerides, which bind fatty acids, remained largely stable, with no hydrolysis or oxidation occurring within one year (the age of the analysed oils), indicating the high quality of the studied oils.

Keywords: cold-pressed grape seed oils, antioxidant potential, total phenols, acid value.

1 UVOD

Danes gojijo grozdje na skoraj vseh celinah, izjema je Antarktika. Trček (2022) poroča, da vinogradi predstavljajo 7.000.000 ha površine Zemlje, kjer raste več kot 1.000 sort grozdja in vse izvirajo iz navadne vinske trte *Vitis vinifera L.*, ki izhaja iz sredozemske regije. Vsaka sorta grozdja vsebuje hranilne in bioaktivne spojine, ki so prisotne v soku ali trdnih delih grozdja. Čeprav je grozdje med najbolj priljubljenim sadjem na svetu, se 60 % le-tega ne poje kot sadje, ampak uporabi za proizvodnjo vina (Trček, 2022). Pri tem se ustvarjajo velike količine odpadkov, kot so grozdna semena, kože, celuloza in drugi ostanki, z eno besedo – tropine. Iz tropin se pri nas ponekod prideluje destilat, t.i. tropinovec in vinska kislina. Tropine se lahko dodajo tudi h krmi živali, v veliki večini pa še vedno ostajajo kot biološki odpadki po stiskanju vina.

Od grozdnih preostankov imajo semena grozdnih pešk največji potencial za proizvodnjo t.i. grozdnih olj; kožice grozdnih jagod vsebujejo veliko polifenolnih spojin, ki so prav tako zanimive z zdravstvenega vidika.

V raziskovalni nalogi se bomo posvetili olju grozdnih pešk. Olje grozdnih pešk (v nadaljevanju OGP) se tradicionalno pridobiva s hladnim stiskanjem, vendar so v literaturi opisane tudi druge tehnike, kot je ekstrakcija z uporabo organskih topil (petroleter in h

eksan) in Soxhletovega aparata, tekočinska ekstrakcija pod znižanim tlakom, superkritična ekstrakcija s CO₂, ultrazvočno podprta ekstrakcija z uporabo nepolarnih topil (Rombaut s sod., 2015; Freitas s sod., 2013). Vse naštetje metode so učinkovite, vendar ne enako stroškovno ali okoljsko sprejemljive. Organska topila je težko povsem odstraniti iz končnega produkta, superkritična ekstrakcija ima visoke zagonske stroške, hladno stiskanje pa manjši izkoristek (Leonard s sod., 2024). Vendar slednje prevladuje v vsakdanji praksi, zato se bomo osredotočili predvsem na OGP, pridobljena na ta način. Zanimali so nas vzorci olj s področja naše bližnje okolice (Podravje). Primerjali jih bomo s hladno stiskanim oljčnim oljem (ang. *extra virgin oil*). Primerjava bo obsegala antioksidativno učinkovitost obeh olj, ki v veliki meri pogojuje tudi njihovo (priporočeno) uporabo. OGP pa bomo preučili tudi z vidika vsebnosti skupnih fenolnih spojin in nevtralizacijskega ali kislinskega števila.

1.1 Opis problema

Grozdne jagode predstavljajo velik vir polifenolov. Njihova vsebnost je pogojena s sorto grozdja, hkrati pa nanje vpliva lega in klimatske razmere v vinogradu, njena starost itd. Rdeče sorte vsebujejo v povprečju okoli 2000 mg/L polifenolnih spojin (v razponu 500–3500 mg/L), medtem ko bele povprečno okrog 200 mg/L polifenolnih spojin (Trček, 2022). Vendar v to niso vštete bioaktivne spojine v grozdnih peškah.

Namen naloge je analizirati antioksidativno učinkovitost OGP lokalnih vinarjev v primerjavi s čistim resveratrolom in hladno stiskanim oljčnim oljem. Ker smo na osnovi prebrane literature skleпали, da so spojine odgovorne za antioksidativno delovanje iz skupine fenolov, nameravamo določiti tudi skupno vsebnost fenolnih spojin v oljih grozdnih pešk ter oceniti njihovo kakovost z vidika prostih maščobnih kislin (določitev kislinskega števila).

Raziskave antioksidativne učinkovitosti OGP so pomembne iz več razlogov. Ti zajemajo:

1. **Zdravje.** Antioksidanti pomagajo zmanjšati oksidativni stres, ki ga povzročajo prosti radikali in posledično zmanjšati tveganja za srčno-žilne bolezni, rak, diabetes in nevrodegenerativne bolezni kot je Alzheimerjeva bolezen (Kopač, 2016).
2. **Daljša obstojnost živil.** Oljčno olje in olje grozdnih pešk, bogato z antioksidanti, pomaga upočasniti proces oksidacije maščob, kar izboljša stabilnost olja in kakovost živil, v katerih se uporabljata. Antioksidanti delujejo kot naravni konzervansi (Trček, 2022).
3. **Okoljski in ekonomski vidik.** Olje grozdnih pešk, ki je stranski produkt vinarstva, predstavlja okolju prijazno možnost za ponovno uporabo materiala, ki zdaj v velikem deležu konča kot biološki odpad.

Raziskave, ki bi neposredno primerjala vsebnosti antioksidantov med hladno stiskanimi oljčnimi olji in hladno stiskanimi olji grozdnih pešk, v dostopni literaturi nismo našli. Znano je le, da obe olji vsebujeta antioksidante. Ker sta obe olji zanimivi tako za kulinariko kot tudi za različne farmacevtske produkte, je takšna raziskava smiselna.

1.2 Cilji raziskave

Zastavili smo si naslednje cilje:

1. Primerjati antioksidativno učinkovitost OGP različnih sort vinske trte z DPPH testom. Zbrali smo pet vzorcev olj s podravske regije, letnik 2023 (letnik 2024 v času izvedbe naše raziskave še ni bil na voljo).
2. Primerjati antioksidativno učinkovitost hladno stiskanih oljčnih olj z DPPH testom. Tudi v tem primeru smo zbrali vzorce hladno stiskalnih olj (*extra virgin oil*) letnik 2023, saj letnik 2024 še ni bil na voljo.
3. Določiti antioksidativno učinkovitost čistega resveratrola z DPPH testom.
4. Določiti vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih OGP, izraženo kot ekvivalent galne kisline (mg/mL) s Folin – Ciocltaeujevim reagentom (F-C reagent).
5. Preučiti, kako visoka je korelacija med antioksidativno učinkovitostjo OGP in skupno vsebnostjo fenolnih spojin.
6. Določiti vsebnost prostih maščobnih kislin v OGP in pridobiti dodatno informacijo o kakovosti preučevanih OGP.

1.3 Hipoteze

Hipoteza 1: Antioksidativna učinkovitost hladno stiskanih olj grozdnih pešk bo v poprečju višja kot antioksidativna učinkovitost vzorcev hladno stiskanih oljčnih olj.

Razlaga: Oljčno olje je bogato z oleinsko kislino, mononenasičeno maščobno kislino, ki je sicer stabilna, vendar ima manjši posreden antioksidativni učinek v primerjavi z OGP, ki vsebuje več linolne kisline, ki je polinenasičena (torej bolj občutljiva na oksidacijo). Zato OGP pogosto spremlja višja vsebnost antioksidantov, saj potreba po zaščiti teh oksidativno ranljivih maščobnih kislin večja (slika 1). Polifenoli so del te obrambe in evolucijsko omogočajo rastlinam večjo odpornost ter prilagodljivost.

Hipoteza 2: Vsebnost skupnih fenolnih spojin se bo med posameznimi olji grozdnih pešk razlikovala.

Razlaga: Rdeče grozdje ima navadno višjo vsebnost polifenolov kot belo grozdje (Trček, 2022). Ker pa na Štajerskem (v Podravju) prevladujejo bela vina in so vinarji, ki se odločijo za pridobivanje olj iz grozdnih pešk, redki, jih večina ne ločuje grozdnih pešk. Posledično olje predstavlja mešanico vseh vrst grozdnih pešk in je sestava precej nepredvidljiva.

Hipoteza 3: OGP bo imelo visoko antioksidativno učinkovitost (AOU), vendar bo čisti resveratrol deloval močnejše.

Razlaga: Grozdne peške vsebujejo veliko fenolnih spojin, vendar jih med stiskanjem »izgubimo«, saj so praviloma slabo topne v olju. V pogači najdemo za približno 2000-krat višjo vsebnost fenolnih spojin kakor v olju (Matthäus, 2008). Njihovo topnost bi lahko povečali le s podaljšano maceracijo (Romanini s sod., 2021). Resveratrol je čista snov; v oljih je mešanica različnih snovi in antioksidanti so prisotni v manjši količini, njihov sinergistični učinek pa verjetno ne presega učinka resveratrola.

Hipoteza 4: Obstaja srednja visoka korelacija med AOU in vsebnostjo polifenolov pri OGP.

Razlaga: Polifenoli so spojine, ki so odgovorne za visok antioksidativen potencial olj grozdnih pešk. Oligomerni proantociandi (OPC) v grozdnih peškah so, po podatkih iz literature, močnejši antioksidanti od vitaminov C, E in beta karotena, zato predvidevamo, da bo korelacija višja od 0,41 (Schwitters, 1995).

Hipoteza 5: Vsebnost prostih maščobnih kislin v OGP bo nizka (manj kot 2 %).

Razlaga: Če predvidevamo, da so v OGP prisotne snovi, ki zavirajo oksidacijo olj, potem bo kljub temu, da bodo preučevana olja stara leto dni, vsebnost prostih maščobnih kislin nizka.

1.4 Metodologija

V nalogi bomo preučili literaturne vire za vsebnost antioksidantov v hladno stiskanih oljčnih oljih in hladno stiskanih OGP letnik 2023. V laboratorijskem delu bomo kolorimetrično določali antioksidativno učinkovitost obeh vrst olj in resveratrola s pomočjo DPPH radikala. Sledilo bo spektrofotometrično določanje skupnih fenolnih spojin v OGP s F-C reagentom in galno kislino kot standardom. Na koncu bomo izvedeli še titracijo prostih maščobnih kislin z 0,1 M KOH.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Bioaktivne spojine v oljih grozdnih pešk

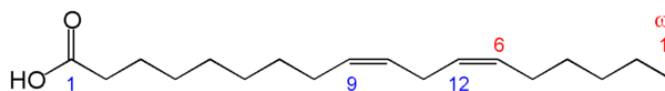
Številne koristne spojine, ki jih najdemo v grozdju, so koncentrirane v semenih, zaradi česar so dragocen vir naravnih snovi. Izkoristek olja iz grozdnih pešk je odvisen od izbrane sorte trte, izvora in tehnike ekstrakcije. Grozdne peške predstavljajo 20–26 % zračno suhih tropin. Semena belega grozdja navadno vsebujejo več olja (do 20 %) kot črne sorte, ki lahko vsebujejo le 6 % maščob po teži (Trček, 2022).



Slika 1. Suha semena grozdnih pešk (lasten vir)

Po teži imajo grozdna semena (peške) približno 35–40 % vlaken, 3 % mineralov, 11 % beljakovin, 7 % vode in 16–20 % olj ter do 7 % polifenolih spojin (Martin s sod., 2020; Trček, 2022). Vidimo, da so grozdne peške vir celuloze, maščob, proteinov in bioaktivnih spojin (fenolne spojine, fitosteroli, tokoferoli) (Di Stefano s sod., 2022; Matthäus, 2008).

Ilknur s sod. (2013) je pri analizi maščobnih kislin prišel do zaključka, da ne glede na sorto grozdja, v oljih grozdnih pešk prevladujejo linolna kislina (56,38–68,56 %), oleinska kislina (16,45–29,38 %), palmitinska (8,19–9,44 %) in stearinska kislina (3,74–4,98 %). Do podobnih zaključkov je prišel tudi Trček (2022), kar pomeni, da v oljih prevladujejo predvsem nenasičene maščobne kisline, kar bi lahko zelo ugodno vplivalo tudi na zdravje ljudi. Linolna kislina sodi med esencialne maščobne kisline, kar pomeni, da je nujno potrebna za človeški organizem, vendar je le-ta ne more sam proizvesti.

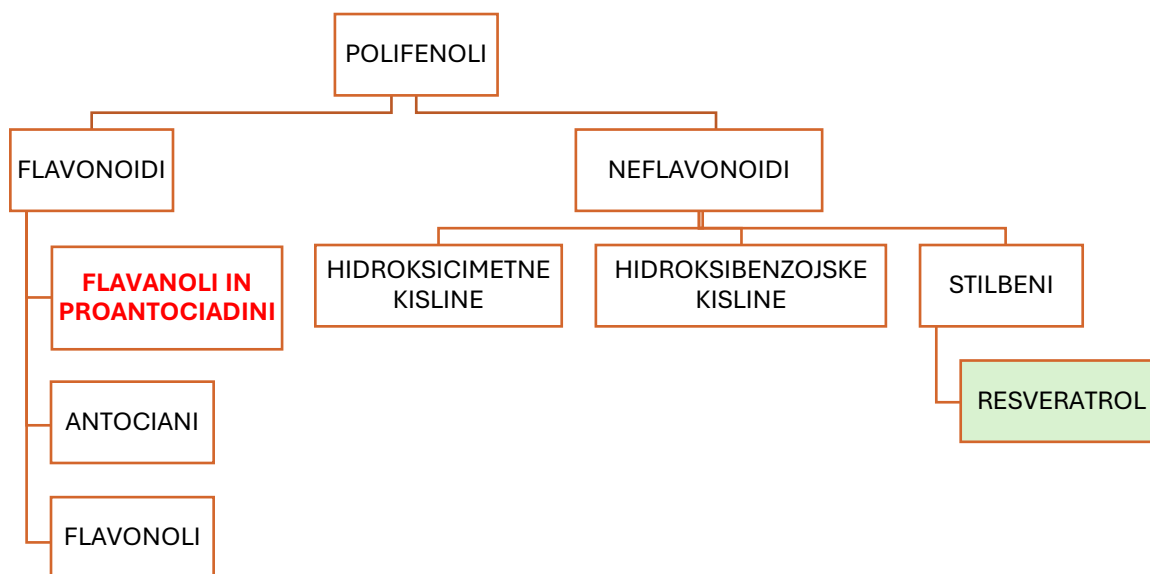


Slika 2. Strukturna formula linolne kisline (Dimić s sod., 2020)

Ker ta drobna semena vsebujejo relativno majhne količine maščob, je učinkovito pridobivanje olja ključ do donosne predelave. Ker so maščobne kisline, ki so prisotne v olju grozdnih semen, zelo občutljive na toploto, je nadzor temperature obdelave eden večjih izzivov (Dimić s sod., 2020). Hladno stiskanje olj je zelo dobra izbira, vendar zahtevna.

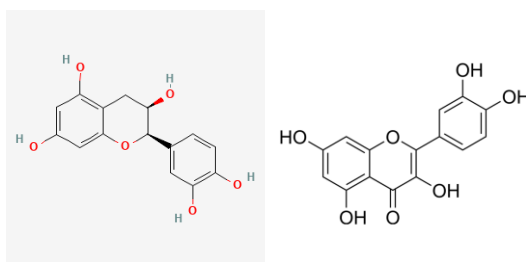
2.1.1 Antioksidanti v oljih grozdnih pešk

Fenolne spojine imajo v svoji zgradbi vsaj en aromatski obroč in nanj vezano eno ali več hidroksilnih skupin (-OH). Če jih imajo vezanih več, govorimo o polifenolih, ki so v grozdju prisotni v večjih količinah. Polifenole, prisotne v grozdju, delimo kot prikazuje organigram 1.



Organigram 1. Fenolne spojine v grozdju

Flavonoidi se nahajajo večinoma v trdnih delih grozdne jagode (peškah, kožici ter pecljevini) in so glavni polifenoli v rdečih vinih (Di Stefano s sod., 2022).



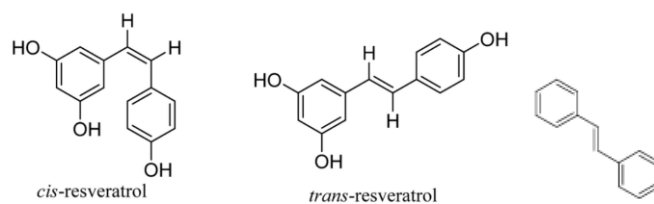
Slika 3. Epikatehin¹ in kvercetin², pogosti fenolni spojini v OGP

Resveratrol je naravna rastlinska spojina, ki jo v največji meri najdemo v grozdni kožici in v grozdnih peškah, prav tako pa je prisotna v vinu in različnih drugih vrstah rastlinske hrane, zlasti v arašidih, jagodičevju in čaju (Ally s sod., 1980). Danes poznamo več kot 70 vrst rastlin, ki resveratrol sintetizira kot odziv na okužbo, stres, poškodbe, bakterijske ali glivične okužbe ter UV-sevanje (Siebert s sod., 1998). Sintezo te molekule v rastlinah katalizira poseben encim, imenovan resveratrol sintaza (Kaur s sod., 2022).

Resveratrol (3,5,4-*trans*-trihidroksiestilbin) sodi v družino stilbenov. Stilbeni so diarileteni in vsebujejo konjugirane dvojne vezi.

¹ Vir slike: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epicatechin#section=Structures>, povzeto 29. 12. 2024

² Vir slike: <https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>, povzeto 29. 12. 2024



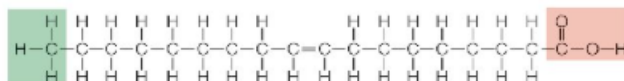
Slika 4. Strukturna formula *cis* in *trans* – resveratrola in desno diariletena (Kaur s sod. , 2022)

Kot vidimo iz slike 5, resveratrol obstaja v *cis* in *trans* izomernih oblikah. Literatura navaja, da je *trans*-resveratrol bolj pogosta in stabilna naravna oblika resveratrola in obenem tista geometrijska izomera, ki ima močno biološko aktivnost. Molekula ima tri hidroksilne skupine, ki sodelujejo pri odstranjevanju prostih radikalov (Kaur s sod., 2022).

Resveratrol kaže širok spekter bioloških lastnosti, vključno z antioksidativnim, protivnetnim, nevroprotektivnim in protirakavim delovanjem. Raziskave kažejo, da ima antioksidativno delovanje tudi veliko povezave z učinkom zaviranja staranja (Leonard s sod., 2024).

2.2 Hladno stiskana ekstra deviška oljčna olja

V olivah se nahaja 25–56 % olja, odvisno od sorte in načina gojenja oljk (Grobiša, 2017). Olivnemu olju daje veliko vrednost predvsem biološko visoko vredna mešanica različnih vrst maščobnih kislin. Deleži le-teh se razlikujejo glede na predel rasti, vrsto oljke, leto in podnebne razmere, okvirna razmerja pa so naslednja: 8–27 % nasičenih, 55–83 % mononenasičenih in 3,5–22 % polinenasičenih maščobnih kislin. Približno desetina kislin je esencialnih. Med njimi sta najbolj pomembni linoleinska (*omega-6*) in α -linolenska (*omega-3*) maščobna kislina, ki sodelujeta pri vzdrževanju varovalnih membran vseh naših celic. Če jih v prehrani ni, se naša sposobnost za delo zmanjša. Ostali prevladujoči deleži so neesencialne maščobne kisline, med katerimi prevladuje oleinska (*omega-9*). Delež oleinske kisline zanaša 66–78 %. Potrebujemo jo za izgradnjo celičnih membran, saj pomaga ohranjati njihovo prehodnost (Santa-María, 2023).

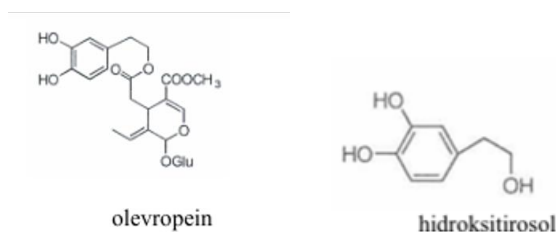


Slika 5. Oleinska kislina³

³ Vir slike: <https://blog.healthmatters.io/2018/11/12/what-is-oleic-acid/>, povzeto 29. 12. 2024

2.2.1 Antioksidanti v oljčnem olju in njihov vpliv na zdravje

Poleg maščobnih kislin v olivnem olju najdemo tudi druge snovi. Med njimi so tudi antioksidanti. V oljčnih oljih prevladujejo fenoli z dvema hidroksilnima skupinama na sosednjih C atomih (*orto-difenoli*) (Butinar s sod., 2006) in sodijo v skupino sekoiridoidnih polifenolov (npr. olevropein in hidroksitirozol).



Slika 6. Fenolne spojine v oljčnem olju (Ryan in sod., 2013).

Polifenoli v olivnem olju imajo antioksidativne, protivnetne, protimikrobne, protivirusne, antiaterogene, antitrombotične, antimutagene in hipoglikemične lastnosti. Fenolne spojine, ki jim pripisujemo antioksidativno delovanje, telo ščitijo pred oksidacijo krvnih lipidov, delujejo protivnetno, pripisujejo jim antikancerogeni potencial in številne druge pozitivne učinke na zdravje ljudi⁴ (Butinar s sod., 2026). Pri ljudeh, ki uživajo z antioksidanti bogato sadje in zelenjavo, je tveganje za srčne in nekatere nevrodegenerativne bolezni zmanjšano, obstajajo pa tudi dokazi, da lahko pripomorejo k preprečevanju nastanka nekaterih oblik raka (World Cancer Research Fund, 2007).

2.3 Delovanje antioksidantiov

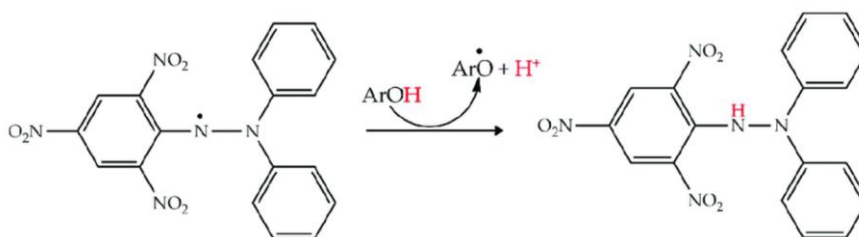
Pri redoks reakcijah, izpostavljenosti UV svetlobi ali visokih temperaturah lahko nastajajo prosti radikali, ki sprožijo verižne radikalske reakcije, posledice teh pa so lahko tudi poškodbe celic. Antioksidanti (reducenti) lahko prekinejo te reakcije, saj reagirajo s prostimi radikali in jih tako nevtralizirajo, s tem pa preprečijo oksidacijo drugih molekul (Aktumsek s sod., 2011).

Oksidacija je reakcija prenosa elektrona iz ene snovi na drugo. Snov, ki elektrone oddaja je reductent, snov, ki jih sprejema je oksidant. Ni oksidacije brez redukcije in obratno (redoks reakcije).

⁴ Številni viri poročajo, da prehrana, bogata z olivnim oljem, ščiti zdravje ljudi pred srčno-žilnimi boleznimi, sladkorno boleznijo tipa 2, debelostjo, rakom, vnetji in oksidativnim stresom (opomba avtoric).

2.3.1 DPPH test

Z namenom določitve antioksidativne učinkovitosti spojin v oljih grozdnih pešk, bomo uporabili radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]). Slednji v stiku z antioksidanti (npr. fenoli) spremeni barvo iz vijolične v rumeno, kar pomeni, da učinkovitost lahko spremljamo kolorimetrično (oz. spektrofotometrično) (Trček, 2022). Fenolne spojine so odlični lovilci kisikovih radikalov in so manj reaktivni od kisikovih radikalov. Posledično lovljenje reaktivnih kisikovih radikalov s fenolnimi spojinami prepreči nadaljnje oksidativne reakcije (Ainsworth s sod., 2007).



Slika 7. Mehanizem delovanja radikala DPPH (levo oksidirana oblika in desno reducirana oblika) (Sadeer s sod., 2020)



2.4 Identifikacija fenolnih spojin

Fenoli (C₆H₅OH) so praviloma brezbarvne spojine, vendar zaradi oksidacije lahko pridobijo barvo. Določitev fenolnih spojin je lahko kvalitativna (npr. reakcija z FeCl₃) ali kvantitativna. Za potrebe te raziskave smo iskali primeren **kvantitativen test** in se odločili za Folin-Ciocalteu test (F-C test).

2.4.1 Test Folin-Ciocalteu (F-C)⁵

Ta test je najpogosteje uporabljena metoda za določanje skupne vsebnosti fenolov v različnih testnih vzorcih. F-C test je kolorimetrična metoda, ki temelji na prenosu enega elektrona med F-C reagentom in fenolnimi spojinami, podobno kot test DPPH (Sánchez-Rangel s sod.,

⁵ F-C reagent se pripravi tako, da se raztopi 100 g natrijevega tungstata (Na₂WO₄·2H₂O) in 25 g natrijevega molibdata (Na₂MoO₄·2H₂O) v 700 mL destilirane vode. Nato se doda približno 50 mL koncentrirane HCl in 50 mL 85 % fosforne kisline, da se raztopina zakisa. Zakisana raztopina se nato 10 ur kuha in ohladi, preden se doda 150 g litijevega sulfata (Li₂SO₄·4H₂O). Nastala raztopina, ki predstavlja F-C reagent, razvije intenzivno rumeno barvo (Ainsworth s sod., 2007).

2013)⁶. Med F–C testom pride do reakcije med F–C reagentom in fenolnimi spojinami v alkalnem mediju (~ pH 10), ki ga dosežemo z dodajanjem natrijevega karbonata (Na₂CO₃). Po redukciji se intenzivna rumena barva F–C reagenta spremeni v modro (Ainsworth s sod., 2007). Galna kislina se lahko uporablja kot referenčni standard (Aktumsek s sod., 2011). Zato je potrebno predhodno najprej pripraviti umeritveno premico s pomočjo galne kisline. Singleton in sod. (1999) navajajo, da so analize, narejene s F-C reagentom, priročne, enostavne, zahtevajo samo osnovno opremo ter dajo primerljive podatke ostalim metodam. Sánchez-Rangel s sod. (2013) potrjuje, da je metoda zelo ekonomična, kot pomanjkljivost pa navajajo, da ni mogoče zagotoviti informacij o vrsti fenolnih spojin.

2.5 VIS Spektrofotometrija

Ko svetloba pade na predmet, jo ta lahko absorbira. Navadno zato, ker valovna dolžina absorbirane svetlobe ustreza elektronskemu vzbujanju v predmetu. Preostala svetloba se prenaša, tj. prehaja skozi predmet. V spektrofotometru se prepustnost meri tako, da se jakosti svetlobe, ki prehaja skozi vzorec (**I**), deli z jakostjo svetlobe, ki prehaja skozi prazen vzorec (**I₀**). Tako lahko določimo prepustnost ali transmitanco (**T**).

Prepustnost (transmitanca): $T = \frac{I}{I_0}$

Logaritemska vrednost transmitance predstavlja t.i. absorbanco (**A**). $A = -\log(T)$

Pri tem upoštevamo Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je količina energije, ki jo absorbira raztopina, sorazmerna z dolžino poti in koncentracijo snovi v kivetu. Matematično jo lahko opišemo kot:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Pri čemer je:

- ✓ ϵ ... molarna absorptivnost (L/mol x cm),
- ✓ l ... dolžina poti (cm) in
- ✓ c ... koncentracija (mol/L).

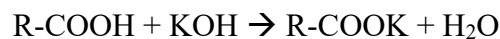
⁶ Rezultati F-C testa so lahko tudi nepravilni, saj test reagira tudi z reducirajočimi sladkorji in askorbinsko kislino (C vitaminom), ki so pogosto prisotni v rastlinskih ekstraktih. Prisotnost teh snovi daje nižje rezultate F-C testa (Ainsworth s sod., 2007). V hladno stiskanih oljih grozdnih pešk tovrstnih snovi (hidrofilnih snovi), glede na poročanja raziskovalcev, praktično ni, zato smo ocenili, da je test primeren za oceno skupnih fenolnih spojin.

Molarna absorptivnost je edinstvena fizikalna konstanta vzorca, ki se nanaša na sposobnost vzorca, da absorbira svetlobo pri določeni valovni dolžini. Enota je $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ in absorbanca zato nima enote.

UV Vis spektrofotometer je instrument, namenjen merjenju absorbance v UV - VIS območju z uporabo Beer-Lambertovega zakona.

2.6 Določitev kislinskega ali nevtralizacijskega števila

Olje daje rahlo kislo reakcijo, saj vsebuje nekatere proste kisline, ki nastanejo pri encimatskem razkroju in hidrolizi gliceridov v masteh in oljih. Razkroj poteka pod vplivom svetlobe in toplote, zato višje vrednosti kislinskega števila kažejo na staranje olja (Kopač, 2023). Kislinsko ali nevtralizacijsko število izrazimo v miligramih kalijevega hidroksida, ki ga porabimo za nevtralizacijo prostih kislin v enem gramu olja.



Ekvivalentno točko določimo s pomočjo indikatorja. Ker titriramo šibko kislino in močno bazo in pričakujemo ekvivalentno točko v bazičnem delu pH lestvice. Zato bomo uporabili indikator fenolftalein, ki je v kislem brezbarven in v bazičnem vijoličen.

3 PRAKTIČNI DEL

3.1 Pridobivanje vzorcev in opis vzorcev ter standardov

Prvi del praktičnega dela je predstavljal zbiranje vzorcev za analizo. Ker živimo na enem najbolj vinorodnih področij Slovenije, smo pričakovali, da bo zbiranje vzorcev lažji del naloge. Iskali smo vzorce hladno stiskanih olj grozdnih pešk, letnik 2023 in vzorce hladno stiskanih slovenskih oljčnih olj, letnik 2023. Izkazalo se je, da od 25 vinarjev v naši neposredni okolici le pet vinarjev daje občasno grozdne peške v hladno stiskanje in pridobivanje olj. Čisti resveratrol smo pridobili kot kontrolni vzorec z nakupom pri ponudniku kemikalij.



Organigram 2. Shematični prikaz praktičnega dela

3.2 Kemikalije in laboratorijski inventar, uporabljen v raziskavi

3.2.1 Kemikalije

- F-C reagent (Karl-Roth, p.a.)
- DPPH reagent (Merck, p.a.)
- Na₂CO₃ (Merck, p.a.)
- Al folija
- Galna kislina (Riedel-de Haën, p.a.)
- Metanol (Riedel-de Haën, 100%)
- Etanol (Riedel-de Haën, 100%)
- Resveratrol (Honeywell Chemicals, p.a.)
- vzorci olj
- 0,1 M KOH
- fenolftalein

3.2.2 Laboratorijski pripomočki

- Spektrofotometer Vernier Go Direct® SpectroVis® Plus s PP kivetami
- Kolorimeter Vernier Go Direct® SpectroVis® s PP kivetami
- 2x bireta z lijem za bireto, 25 mL [±0,05 mL]
- 1-krat 250 mL merilna bučka
- 6 x 100 mL merilna bučka
- 1x – 50 mL merilna bučka
- 10 x – 10 mL merilna bučka
- Analitska tehnica, KERN [±0,001 g]
- Merilna pipeta z žogico za pipetiranje, 10 mL [±0,01 mL]
- Pasteurjeve pipete, 3 mL [±0,025 mL]
- čaše
- 200 mL erlenmajerice

3.3 Opis vzorcev hladno stiskanih olj grozdnih pešk

Preglednica 1. Opisi preučevanih vzorcev hladno stiskanih olj iz grozdnih pešk

Vzorec (opis)	Kratica proizvajalca	Letnik	Oznaka vzorca
Rumen	HVK	2023	A
rumeno-zelen	M	2023	B
rumeno-zelen	VK	2023	C
zeleno-rumen	VV	2023	D
Rumen	VK*	2022	E

* Opomba: žal na območju 25 vinarskih kmetij nismo našli 5 vinarjev, ki bi nam lahko ponudili hladno stiskano olje grozdnih pešk letnik 2025, zato je peti vzorec predstavljal letnik 2022, vinarja iz naše občine.

3.4 Opis vzorcev hladno stiskanih oljčnih olj

Preglednica 2. Opisi preučevanih vzorcev hladno stiskanih oljčnih olj

Vzorec (opis)	Proizvajalec	Letnik	Oznaka vzorca
zlato rumen	Ekstra deviško oljčno olje SI	2023	1
zlato rumen	Ekstra deviško oljčno olje GEA	2023	2
rumeno-zelen, rahlo moten	Ekstra deviško oljčno olje V	2023	3
rumeno-zelen	Ekstra deviško oljčno olje H	2023	4
zlato rumen	Ekstra deviško oljčno olje X	2023	5

3.5 Priprava vzorcev olj

Vzorec pripravimo tako, da 0,50 – 0,75 g olja v kivetu zmešamo z 1 ml metanola. Dobljena gostota vseh vzorčenih olj je bila določena kot 0,72 g/ml. Vsebino smo premešali s tanko stekleno palčko.

3.6 Določanje antioksidativne učinkovitosti olj

V 100 mL bučko smo zatehtali 4 mg DPPH. Dodali smo 20 mL metanola⁷ ter dobro premešali, da se je DPPH popolnoma raztopil. Nato smo postopoma dodajali metanol toliko časa, da smo dosegli absorbanco raztopine približno 1,5.

Za določanje antioksidativnega potenciala smo pripravili še **referenčno vrednost (RF)** in sicer tako, da smo v 4 ml kiveti zmešali 0,60 ml metanola in dodali 3,0 ml sveže pripravljene raztopine DPPH.

Vzorec (V), ki smo ga analizirali, smo pripravili tako, da smo v 4 mL kiveto dodali 0,60 mL vzorca, ki smo ga predhodno pripravili in dodali 3,0 mL sveže pripravljene raztopine DPPH.

Slepo probo (SP) smo pripravili tako, da smo v 4 mL kiveto dodali 0,60 mL vzorca in 3,0 mL metanola (brez DPPH).

Vse pripravljene zmesi smo dobro premešali. Absorbanco smo merili na valovni dolžini, ki je kazala najvišjo absorbanco, to je 470 nm. Pri tem smo uporabili Go Pro Vernier kolorimeter®.⁸

Izračun antioksidativnega potenciala olj smo izračunali kot antioksidativni potencial (AOP) DPPH v mmol/kg olja. Najprej smo določili razliko v absorbanci med vzorcem, referenčno vrednostjo in slepo probo. Nato smo izračunali množino snovi in na koncu AOP. Uporabili smo naslednje enačbe:

$$\Delta A = RF - V + SP$$

Legenda:

ΔA ... razlika v absorbanci

V ... izmerjena absorbanca vzorca pri 470 nm

RF ... izmerjena absorbanca pri 470 nm referenčne vrednosti

SP ... izmerjena absorbanca slepe probe pri 470 nm

$$n = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l} \cdot V_{reakcijske\ zmesi} \text{ [mol]}$$

Legenda:

n ... množina snovi

ϵ ... molarni absorpcijski koeficient ($\epsilon = 12000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

$V_{reakcijske\ zmesi}$... volumen reakcijske zmesi ($V = 0,0018 \text{ L}$)

l ... dolžina poti žarka skozi kiveto (1 cm)

⁷ Trček (2022) kot ustrezno topilo navaja heksan. Sprva smo ga uporabili tudi mi, vendar se je DPPH v njem zelo slabo raztapljal. Raztopina je bila rjava, z jasno vidnimi neraztopljenimi delci DPPH. Zato smo uporabili metanol, ki se izkazal kot mnogo boljše topilo.

⁸ Strokovna literatura navaja, da ima DPPH najvišjo absorbanco pri 517 nm. Naša aparatura te natančnosti ni omogočala, zato smo meritve izvajali pri 470 nm, kjer je bila izmerjena najvišja absorbanca.

$$\text{AOP} = \frac{n}{m(\text{vzorca olja})} \text{ [mmol/kg olja]}$$

Zmožnost inhibicije DPPH, izraženo v odstotkih, smo izračunali kot:

$$\text{inhibicija DPPH (\%)} = \left(\frac{A^0 - A'}{A^0} \right) \times 100$$

Legenda:

A^0 ... začetna absorbanca slepega vzorca. A' ... absorbanca vzorcev olja po 10 minutah (400 sekundah)

3.7 Določanje skupnih fenolnih spojin v hladno stiskanih oljih grozdnih pešk

Za določanje skupnih fenolov smo uporabili FC metodo. Metoda temelji na reakciji oksidacije med fenolnimi spojinami in kislina $H_3PMO_{12}O_{40}$ in $H_3PW_{12}O_{40}$, pri čemer nastane kompleks, ki se glede na vsebnost fenolnih spojin obarva bolj ali manj intenzivno modro. Za referenčno spojino je bila uporabljena galna kislina, zato se vsebnost skupnih fenolov podaja v miligramih galne kisline na gram vzorca (Koron, 2023).

Priprava reagentov za določanje skupnih fenolnih spojin

Najprej smo si morali pripraviti raztopine reagentov. **Raztopino FC** smo pripravili tako, da smo reagent razredčili z destilirano vodo v razmerju F-C reagent: voda = 1:10.

Raztopino **natrijevega karbonata** smo pripravili tako, da smo v 250 mL merilno bučko zatehtali 18,75 g Na_2CO_3 in do oznake razredčili z deionizirano vodo. Pripravljeni raztopini reagentov smo za nekaj časa dali na magnetno mešalo, da se je vse dobro premešalo in raztopilo. Splošna metodologija določanja skupnih fenolnih spojin zahteva, da po dodatku vzorca, F-C reagenta, destilirane vode in natrijevega karbonata, mešanico pustimo stati 2 uri pri sobni temperaturi in nato izmerimo absorbanco. V nalogi smo uporabili nekoliko prilagojeno metodo, ki je celotno določitev pospešila (povzeto po Koron, 2023). Opisana je pri pripravi umeritvene premice za galno kislino. Sledila je priprava standarda – galne kisline (Aktumsek s sod., 2011).

3.7.1 Priprava umeritvene premice z galno kislino

Pri določanju začetne koncentracije galne kisline smo izhajali iz podatkov, ki so jih predhodno opravili na različnih vzorcih olj grozdnih pešk Terček (2022) in Koron (2023). Njuni rezultati

se razlikujejo, vendar se gibljejo v razponu 10 mg ekvivalenta galne kisline (EGA)/kg olja–200 mg EGA/kg olja. Zato smo izhodiščno raztopino galne kisline, ki smo jo potem redčili, pripravili v tem koncentracijskem območju.

Delo:

1. V 100 mL bučko smo zatehtali 0,4 g galne kisline (GA) in do oznake razredčili z metanolom. Dobili smo osnovno raztopino galne kisline s koncentracijo 4 g/L.
2. Iz osnovne raztopine smo pripravili 5 razredčin. Redčenje smo izvedli v 100 mL merilnih bučkah. Z bireto smo odmerili volumen 4 g/L GA, kot je prikazano v preglednici 3 in do oznake dolili deionizirano vodo.

Preglednica 3. Koncentracija galne kisline za umeritveno premico

V (1,6 g GA/L) [±0,05 mL]	Redčitveni faktor	Masna koncentracija, [mg/L]
10,00	10 krat	400
7,50	25 krat	300
5,00	50 krat	200
2,50	75 krat	100
1,00	100 krat	40

3. En mililiter vsake raztopine smo odpipetirali v 50 mL čašo, s pomočjo birete dodali 15 mL F-C reagenta in 12 mL Na_2CO_3 , ovili čašo z Al folijo ter termostatirali 5 minut pri 50 °C (vodna kopel). Raztopine smo ohladili na sobno temperaturo in jim s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 760 nm. Na osnovi izmerjenih absorbanc smo lahko izrisali graf odvisnosti absorbance od masne koncentracije galne kisline. Na osnovi grafa smo določili enačbo premice, ki smo jo uporabili pri izračunih vsebnosti skupnih fenolnih spojin za vzorce olj.

Kot **kontrolni vzorec** smo namesto galne kisline odpipetirali metanol, ki smo mu v enakem razmerju dodali F-C reagent in Na_2CO_3 .

3.7.2 Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili tako, da smo v 25 mL merilne bučke zatehtali 50 mg olja in jih do oznake razredčili z metanolom ter dobro premešali. Nato smo 1 mL vzorca odpipetirali v čašo, dodali 15 mL FC reagenta in 12 mL Na_2CO_3 ter termostatirali 5 minut pri 50 °C. Raztopine smo nato ohladili in izmerili absorbance pri valovni dolžini 760 nm. Vsebnost skupnih fenolov smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje po naslednji enačbi:

$$\gamma = \frac{Abs-b}{a}$$

kjer je:

γ ... masna koncentracija galne kisline [mg/mL]

b ... odsek premice umeritvene krivulje na ordinati

Abs ... izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 760 nm

a ... naklon premice umeritvene krivulje

Vsebnost skupnih fenolov, ki se izraža v mg GA/100 g olja, smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\omega GA(\text{olja}) = \frac{\gamma GA}{\gamma \text{olja}} \times 10^5$$

kjer je:

$\omega GA(\text{olja})$... vsebnost skupnih fenolov v olju [mgGA/100 g olja]

γGA ... masna koncentracija GA v raztopini [mg/mL]

$\gamma_{\text{ekst.}}$... masna koncentracija v raztopini vzorca [mg/mL]

4 MERITVE

4.1 Antioksidativna učinkovitost olj grozdnih pešk

Za vsak vzorec olja smo meritev 3 krat ponovili in v izračun vzeli poprečno vrednost vseh treh meritev po 400 sekundah ter 10 minutah. Ker Vernierov Go Direct Colorimeter® ne omogoča izbire točno določene valovne dolžine, smo valovno dolžino maksimalne absorbance določili tako, da smo med štirimi valovnimi dolžinami aparature (430 nm, 470 nm, 565 nm in 635 nm) izbrali tisto, ki je kazala najvišjo absorbanco. To je bilo pri 470 nm. Kolorimeter smo predhodno umerili z metanolom.



Slika 8. Kolorimeter, uporabljen v raziskavi (lasten vir)

Preglednica 4. Sprememba absorbance za vzorec A.

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,50	1,50
150	1,33	1,30	1,32
250	1,22	1,16	1,22
350	1,11	1,11	1,12
400	1,00	1,01	1,02
Poprečje po 400 sekundah	1,01		
Poprečje po 10 minutah	0,44		

Preglednica 5. Sprememba absorbance za vzorec B.

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,50	1,50	1,51
150	1,42	1,36	1,36
250	1,35	1,18	1,19
350	1,27	1,09	1,12
400	1,06	0,98	1,02
Poprečje po 400 sekundah	1,02		
Poprečje po 10 minutah	0,43		

Preglednica 6. Sprememba absorbance za vzorec C

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,51	1,51
150	1,31	1,31	1,37
250	1,21	1,20	1,22
350	1,11	1,12	1,13
400	1,07	1,06	1,03
Poprečje po 400 sekundah	1,05		
Poprečje po 10 minutah	0,48		

Absorbanca referenčnega vzorca (RF): 1,50 (za meritve vzorcev A, B, C). Absorbanca slepe probe: 0,00.

Preglednica 7. Sprememba absorbance za vzorec D

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,63	1,64	1,64
150	1,34	1,36	1,38
250	1,06	1,06	1,10
350	0,85	0,97	1,90
400	0,75	0,80	0,81
Poprečje po 400 sekundah	0,79		
Poprečje po 10 minutah	0,36		

Preglednica 8. Sprememba absorbance za vzorec E

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,58	1,58	1,58
150	1,28	1,32	1,32
250	1,18	1,26	1,29
350	1,18	1,21	1,24
400	1,18	1,16	1,24
Poprečje po 400 sekundah	1,19		
Poprečje po 10 minutah	1,10		

Absorbanca referenčnega vzorca (RF): 1,63 (za meritve vzorcev D, E).

Absorbanca slepe probe: 0,00.



Slika 9. Sprememba barve DPPH po 400 sekundah (sredinska kiveta in po 10 minutah (skrajno desna kiveta) (lasten vir)

4.1.1 Izračuni

Antioksidacijski potencial (AOP) analiziranih olj grozdnih pešk smo izrazili kot mmol DPPH/kg olja in kot % inhibicije DPPH. Pri izračunih smo uporabili enačbe, predstavljene v poglavju

3.6. Primer izračuna za vzorec 1:

$$\Delta A = 1,50 - 1,01 + 0,0 = 0,49$$

$$n = \frac{0,49}{(12000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}} \times 0,0018 \text{ L} = 7,35 \times 10^{-8} \text{ mol} = 7,35 \times 10^{-5} \text{ mmol}$$

$$\text{AOP (DPPH)} = \frac{n}{m(\text{olja})} \text{ [mmol/kg olja]}$$

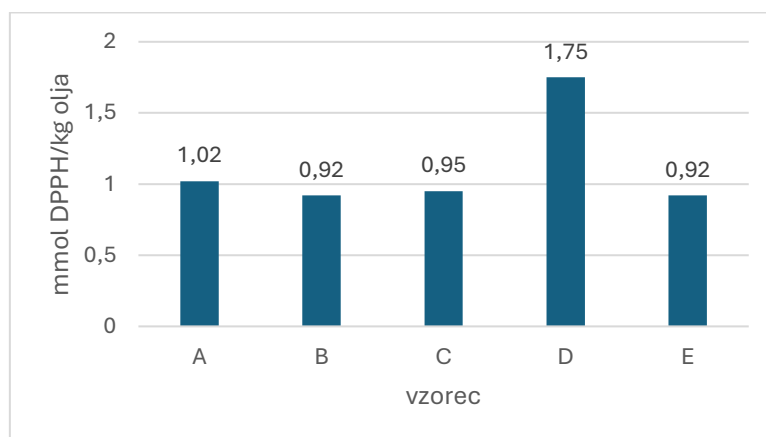
$$\text{DPPH (mmol/kg olja)} = \frac{0,0000735 \text{ mmol}}{0,000072 \text{ kg}} = 1,02 \frac{\text{mmol}}{\text{kg}}$$

$$\text{inhibicija DPPH (\%)} = \left(\frac{1,50 - 0,79}{1,50} \right) \times 100 = 47,3 \text{ \% po 400 sekundah}$$

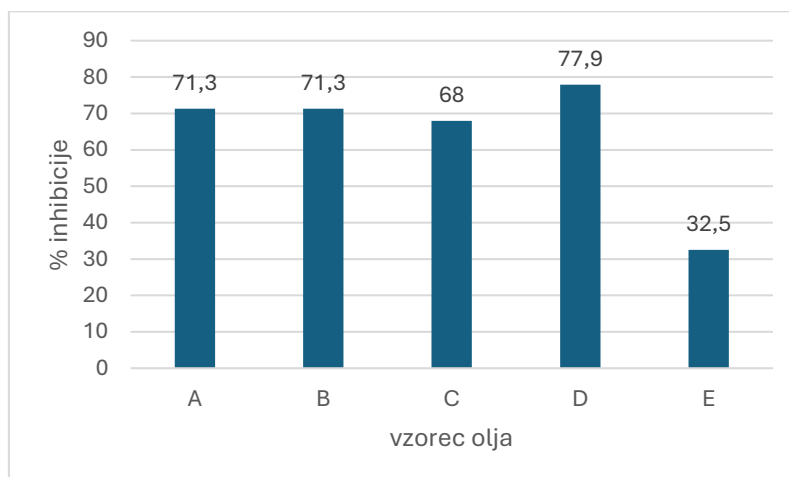
$$\text{inhibicija DPPH (\%)} = \left(\frac{1,50 - 0,43}{1,50} \right) \times 100 = 71,3 \text{ \% po 10 minutah}$$

Preglednica 9. Izračun antioksidacijskega potenciala DPPH, izražen kot mmol DPPH/kg olja in antioksidacijskega potenciala AOP, izražen v odstotkih po 400 sekundah in 10. minutah

Vzorec	ΔA	n [mmol]	DPPH [mmol/kg olja]	Inhibicija DPPH, po 400 sek [%]	Inhibicija DPPH po 10 min [%]
A	0,49	$7,35 \times 10^{-5}$	1,02	32,7	71,3
B	0,44	$6,6 \times 10^{-5}$	0,92	32,0	71,3
C	0,46	$6,9 \times 10^{-5}$	0,95	30,0	68,0
D	0,84	$1,26 \times 10^{-4}$	1,75	51,5	77,9
E	0,44	$6,6 \times 10^{-5}$	0,92	27,0	32,5



Graf 1. Antioksidativna aktivnost hladno stisanih olj grozdnih pešk, izražena v mmol DPPH/kg olja



Graf 2. % inhibicije DPPH po 10 minutah

Takoj opazimo, da večjih razlik med hladno stisanimi olji grozdnih pešk, letnik 2023, ni. Navzdol odstopa vzorec E, ki je bil letnik 2022. Po 400 sekundah je inhibicija DPPH radikala dosegla 30–33 %. Po 10 minutah smo opazili, da je prišlo do popolne spremembe DPPH radikala iz vijolične v rumeno pri vseh treh vzorcih, izjema je vzorec E.

Odstotek inhibicije se je po 10. minutah dvignil na 68–78 %. Izjema je spet vzorec E. Odstopa tudi vzorec D, z visoko stopnjo inhibicije že po 400 sekundah (51 %) in po 10 minutah skoraj 78 %. Vzorec E predstavlja letnik 2022 in predpostavimo lahko, da so nižje vrednosti povezane z dejstvom, da se je del antioksidantov v oljih že oksidiriral zaradi starosti vzorca in s tem zaščitil pred oksidacijo maščobne kisline.

Vrednost antioksidacijskega potenciala (AOP) v oljih grozdnih pešk znaša okoli 1 mmol DPPH/kg, izjema je vzorec D z 1,75 mmol DPPH/kg olja. Meritve antioksidativnega potenciala olj grozdnih pešk je analiziral tudi Trček (2022), ki poroča o nekoliko višjih vrednostih od 3,34 mmol DPPH/kg olja do 4,14 mmol DPPH/kg olja. Najvišji antioksidativni potencial so v njegovi raziskavi pokazala olja iz rdečih sort (4,14 mmol DPPH/kg olja), najnižjo vrednost AOP pa so imela olja iz neznanih sort (3,34 mmol DPPH/kg olja). Ker za vzorce olj, ki smo jih pridobili, ne vemo iz kakšnih sort grozdja so bili narejeni, ocenjujemo, da so vrednosti meritev v velikostnem razredu olj z nižjo vrednostjo AOP, vendar še vedno izjemno visoko zmogljivostjo inhibicije DPPH radikala.

Predvidevamo, da bi bile vrednosti AOP hladno stiskanih olj grozdnih pešk višje, če bi predhodno fenolne spojine ekstrahirali. Pri delu smo se ves čas srečevali z izzivom kako olja, ki so izrazito nepolarne snovi, »spraviti v kontakt« z reagenti, ki so polarne snovi. Sprva smo za izolacijo fenolnih spojin nameravali uporabiti lij ločnik, kjer bi olju najprej dodali heksan in nato še 80 % metanol ter ekstrakcijo nekajkrat ponovili. Vendar bi po končani ekstrakciji morali odstraniti topilo, kar pa samo z izparevanjem ne bi šlo; morali bi uporabiti rotavapor, ki zaradi vakuumu omogoča izhlapevanje pri nižjih temperaturah, ki ga žal nismo imeli. Težavo smo rešili tako, da smo mešanice pred meritvijo intenzivno mešali s pomočjo magnetnega mešala in pazili, da je bila raztopina v kiveti vedno brez mehurčkov oz. transparenta.

Na rezultate meritev je zagotovo vplivalo tudi dejstvo, da absorbance nismo merili pri 517 nm, kjer ima DPPH najvišjo absorbanco, ampak pri 470 nm.

AOP je povezan tudi s sestavo olj. Dimić in sod. (2020) so ugotovili, da je postopek ekstrakcije olja eden ključnih dejavnikov, ki vpliva na antioksidativni potencial v olju grozdnih pešk. Na sestavo antioksidantov v olju grozdnih pešk ima lahko velik vpliv tudi zrelost grozdja (Blainski in sod., 2005), postopki pridobivanja olja (Passos in sod., 2009; Santos Freitas in sod., 2008). Podatkov o tem za naše vzorce nismo imeli. Zato smo v nadaljevanju preučili tudi njegov AOP.

4.2 Antioksidativna učinkovitost hladno stiskanih oljčnih olj

Absorbanca referenčnega vzorca (RF): 1,52 (za vse meritve). Absorbanca slepe probe: 0,00

Preglednica 10. Sprememba absorbance za vzorec 1

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,50	1,50
150	1,40	1,43	1,42
250	1,30	1,29	1,32
350	1,25	1,25	1,24
400	1,20	1,19	1,20
Poprečje po 400 sekundah	1,20		
Poprečje po 10 minutah	0,88		

Preglednica 11. Sprememba absorbance za vzorec 2

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,51	1,51
150	1,38	1,36	1,38
250	1,30	1,32	1,29
350	1,25	1,24	1,22
400	1,11	1,08	1,10
Poprečje po 400 sekundah	1,09		
Poprečje po 10 minutah	0,90		

Preglednica 12. Sprememba absorbance za vzorec 3

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,50	1,50
150	1,40	1,36	1,40
250	1,31	1,29	1,28
350	1,22	1,21	1,19
400	1,19	1,18	1,16
Poprečje po 400 sekundah	1,17		
Poprečje po 10 minutah	0,94		

Preglednica 13. Sprememba absorbance za vzorec 4

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,50	1,50
150	1,32	1,30	1,29
250	1,20	1,19	1,18
350	1,00	1,04	1,06
400	0,90	0,88	0,89
Poprečje po 400 sekundah	0,98		
Poprečje po 10 minutah	0,70		

Preglednica 14. Sprememba absorbance za vzorec 5

t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,50	1,50
150	1,42	1,39	1,38
250	1,33	1,30	1,25
350	1,16	1,19	1,12
400	1,08	1,08	1,08
Poprečje po 400 sekundah	1,08		
Poprečje po 10 minutah	0,82		

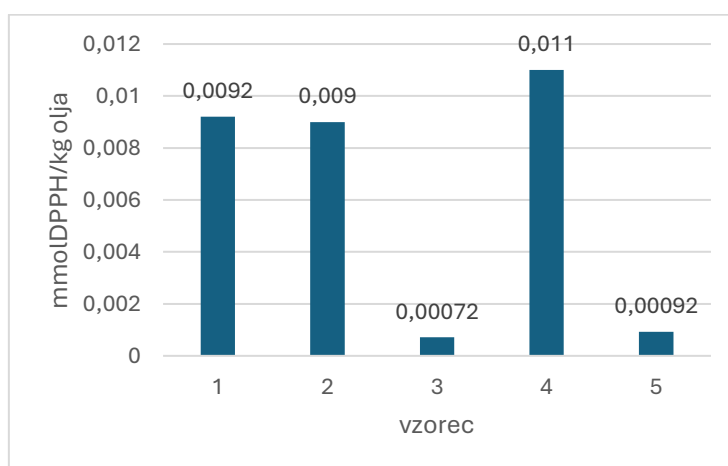
4.3 Antioksidativni potencial resveratrola

Preglednica 15. Sprememba absorbance DPPH za resveratrol

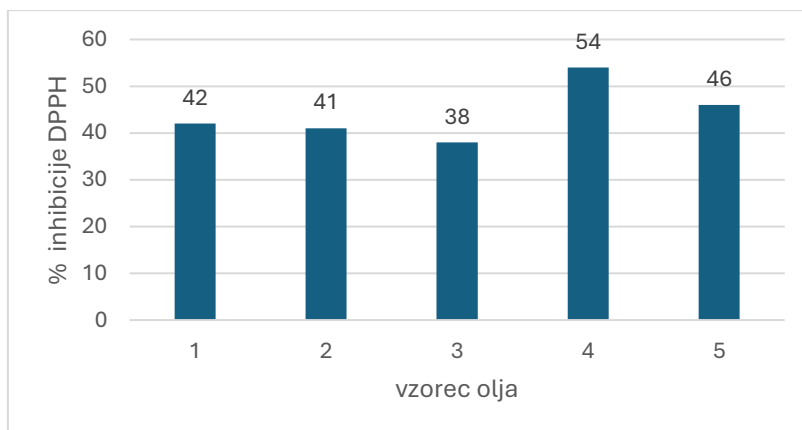
t [± 2 s]	1. meritev [λ_{470} nm]	2. meritev [λ_{470} nm]	3. meritev [λ_{470} nm]
0	1,51	1,50	1,50
150	0,96	1,00	0,99
250	0,88	0,86	0,82
350	0,58	0,59	0,60
400	0,42	0,45	0,46
Poprečje po 400 sekundah	0,44		
Poprečje po 10 minutah	0,30		

Preglednica 16. Izračun antioksidativnega potenciala DPPH, izražen kot mmol DPPH/kg olja in antioksidativnega potenciala AOP, izražen v odstotkih po 400 sekundah.

Vzorec	ΔA	n [mmol]	DPPH [mmol/kg olja]	Inhibicija DPPH, po 400 sek [%]	Inhibicija DPPH po 10 min [%]
1	0,32	$4,8 \times 10^{-7}$	$9,2 \times 10^{-3}$	21	42
2	0,43	$6,45 \times 10^{-7}$	$9,0 \times 10^{-3}$	28	41
3	0,35	$5,25 \times 10^{-7}$	$7,2 \times 10^{-4}$	23	38
4	0,54	$8,1 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-2}$	36	54
5	0,44	$6,6 \times 10^{-7}$	$9,2 \times 10^{-4}$	29	46



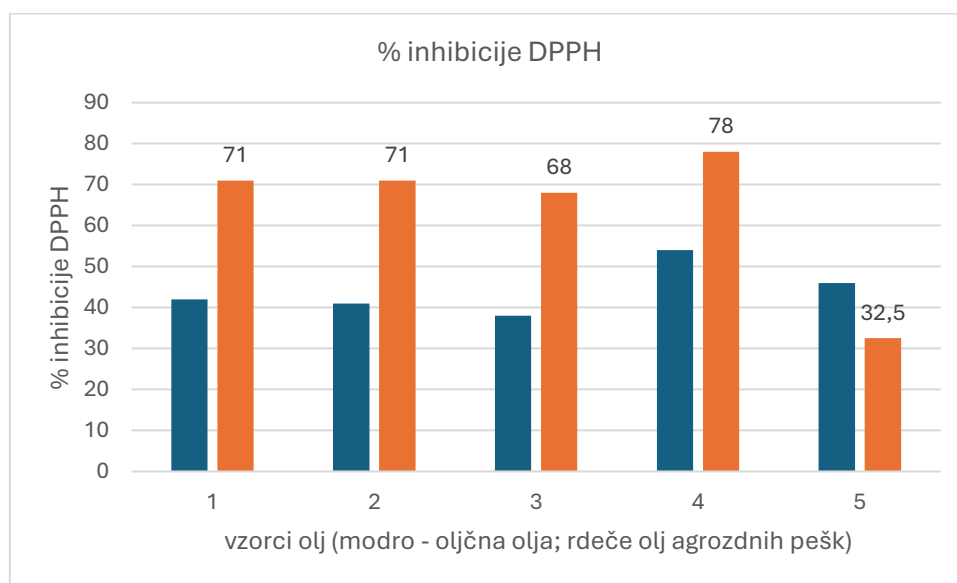
Graf 3. Antioksidativna aktivnost hladno stisanih oljnih olj, izražena v mmol DPPH/kg olja



Graf 4. % inhibicije DPPH po 10 minutah

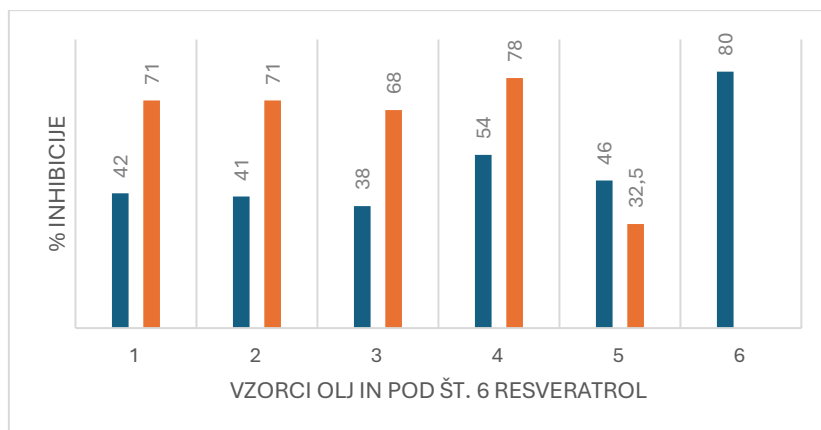
Primerjava antioksidativnega potenciala hladno stiskanih olj grozdnih pešk in hladno stiskanih oljčnih olj pokaže, da imajo hladno stiskana olja grozdnih pešk mnogo višji antioksidativni potencial. Na grafu 5 vidimo, da so vsa olja grozdnih pešk (**oranžni stolpci**) izkazovala bistveno višji odstotek inhibicije radikala DPPH kot hladno stiskana oljčna olja (**modri stolpci**). Izjema je le vzorec E (olje grozdnih pešk), ki pa predstavlja vzorec letnika 2022.

Predvidevamo, da so tudi ti rezultati nižji od realnih, saj bi fenolne spojine morali predhodno ekstrahirati.



Graf 5. Primerjava uspešnosti inhibicije DPPH med oljčnimi olji in olji grozdnih pešk

Zaključimo lahko, da je antioksidativna sposobnost hladno stiskanih oljčnih olj letnik 2023 v primerjavi z antioksidativno sposobnostjo hladno stiskanih olj grozdnih pešk, letnik 2023, v povprečju 30 % nižja. Najvišjo AOP pa je pokazal čisti resveratrol (vzorec šest na grafu 6).



Graf 6. % Inhibicije DPPH radikala resveratrola (št. vzorca 6) v primerjavi z AOP hladno stisanimi oljčnimi olji ter hladno stisanimi olji grozdnih pešk

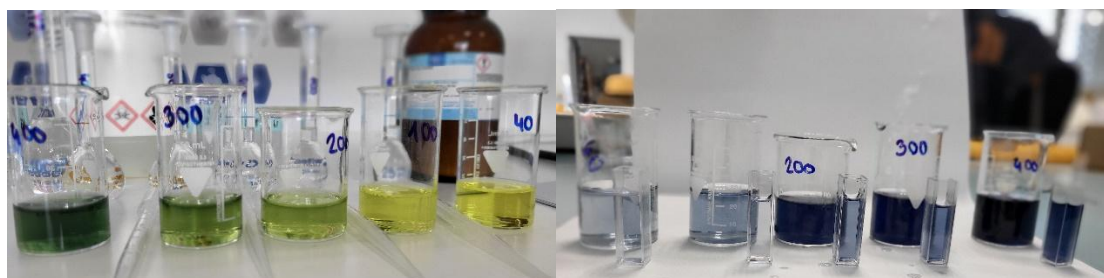
4.4 Vsebnost skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določali z Vernierovim spektrofotometrom. Spektrofotometer Go Direct® SpectroVis® Plus, ki kot vir svetlobe uporablja LED-diodo in volframovo žarnico ter linearni detektor.

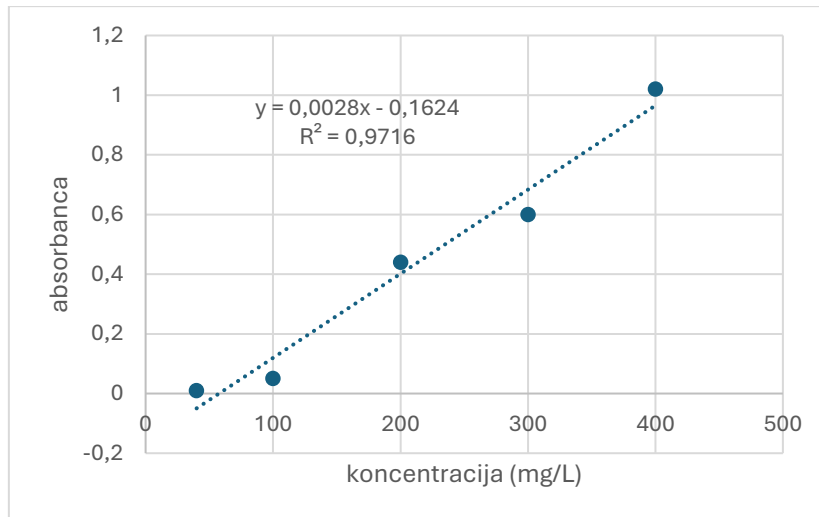
4.4.1 Umeritvena premica za galno kislino

Preglednica 17. Podatki za umeritveno premico za galno kislino

Masna koncentracija galne kisline, [mg/L]	Absorbanca [$\lambda_{760\text{ nm}}$]
400	1,02
300	0,60
200	0,44
100	0,05
40	0,01



Slika 10. F-C test (levo takoj po dodatku reagentov in desno po 5 min segrevanju na 50°C (lasten vir))



Graf 7. Umeritvene premica za galno kislino

Enačba premice: $y=0,0028x - 0,1624$

4.4.2 Vsebnost skupnih fenolov v vzorcih hladno stisanih olj grozdnih pešk

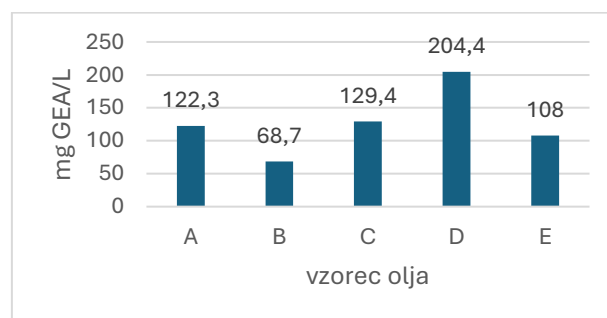
Primer izračuna za vzorec 1:

Masna koncentracija skupnih fenolnih spojin, izražena kot ekvivalent galne kisline =

$$\frac{0,18+0,1624}{0,0028} = 122,3 \frac{mg}{L}$$

Preglednica 18. Podatki za izračun skupnih fenolnih spojin v vzorcih hladno stisanih OGP

Vzorec	Absorbanca [$\lambda_{760 nm}$]	mg/L
A	0,18	122,3
B	0,03	68,7
C	0,20	129,4
D	0,41	204,4
E	0,14	108,0



Graf 8. Koncentracija skupnih fenolnih spojin v vzorcih hladno stisanih olj grozdnih pešk

V meritvah smo uporabili 0,6 g olja. Rezultati preračunani na gram olja so prikazani v preglednici 19.

Primer izračuna: $\gamma \text{ (mg/L)} = \frac{m}{V}$ $m = \delta \times V = 0,1223 \text{ mg v } 0,6 \text{ g olja} \rightarrow \mathbf{0,204 \text{ mg SF/g olja}}$

Preglednica 19. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v oljih grozdnih pešk

Vzorec	Vsebnost skupnih fenolnih (SF) spojin [mg/g olja]
A	0,204
B	0,115
C	0,216
D	0,340
E	0,180

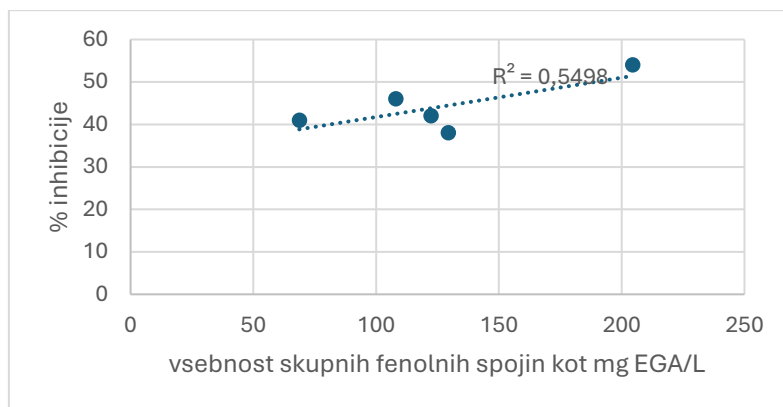
Koron (2023) v raziskavi, ki je zajemala peške različnih vrst grozdja, ki jih pridelujemo v Sloveniji, navaja, da hladno stiskana olja vsebujejo različne fenolne spojine. Vsebnosti so se pri različnih vrstah gibale 0,0141 mg/g olja–0,035 mg/g olja. Če primerjamo te vrednosti z vrednostmi, dobljenimi v tej raziskavi, opazimo, da so naši rezultati za faktor 10-krat nižji. Tudi Slokarjeva (2010) v raziskavi, kjer je prav tako s F-C metodo določala vsebnost skupnih fenolnih spojin, navaja precej višje vrednosti, 0,091 mg/g–0,530 mg/g.

Izmed vseh preučevanih vzorcev spet odstopa vzorec D, ki kaže najvišjo vrednost skupnih fenolnih spojin, najnižjo vrednost pa smo zabeležili pri vzorcu B in nato E. Glede na rezultate testa z DPPH preseneča razlika v deležu skupnih fenolnih spojin med vzorcem A in B. Izmerjene vrednosti vzorcev smo ocenili kot (pre)nizke.

4.5 Izračun korelacije med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AOP

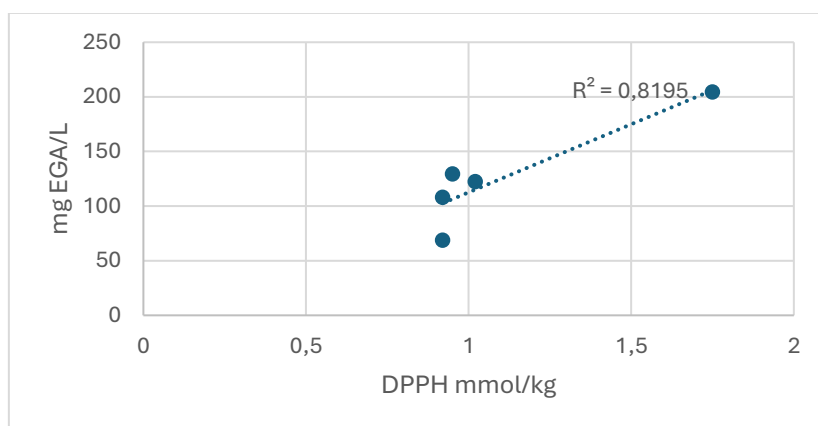
Korelacijo med AOP in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin smo izračunali tako, da smo v graf vstavili AOP proti koncentraciji skupnih fenolnih spojin (mg EGK/L), določili enačbo premice in stopnjo ujemanja podatkov (R^2). Nato smo s pomočjo spodnje enačbe izračunali korelacijski koeficient.

$$\text{Korelacijski koeficient} = \sqrt{R^2}$$



Graf 9. Korelacija med % inhibicije DPPH in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za olja grozdnih pešk

$$\text{Korelacijski koeficient} = \sqrt{0,55} = 0,74$$



Graf 10. Korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za olja grozdnih pešk in DPPH (mmol/kg olja)

$$\text{Korelacijski koeficient} = \sqrt{0,82} = 0,90$$

Trček v svoji raziskavi navaja pomen korelacijskega koeficienta in sicer:

Preglednica 20. Pomen korelacijskega faktorja (Trček, 2022)

Korelacijski koeficient	Pomen
0,00- 0,20	Povezanosti ni
0,21 – 0,40	Nizka ali delna povezanost
0,41 – 0,70	Srednja, zmerna povezanost
0,71 – 0,91	Visoka ali tesna povezanost
0,91 – 1,00	Zelo visoka povezanost

Iz podatkov grafov 9 in 10 lahko zaključimo, da je med antioksidativno učinkovitostjo ter vsebnostjo skupnih fenolnih spojin pri hladno stiskanih oljih grozdnih pešk visoka ali tesna povezanost, saj so korelacijski faktorji visoki (0,74–0,90).

4.6 Določitev kislinskega ali nevtralizacijskega števila

Kislinsko ali nevtralizacijsko število izrazimo v miligramih kalijevega hidroksida, ki ga porabimo za nevtralizacijo prostih kislin v enem gramu olja. Za izvedbo titracije smo potrebovali: 1 L mešanice etanol – toluen (1 : 1), fenolftalein, 250 mL etanolne raztopine kalijevega hidroksida ($c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$), 15-krat 200 mL erlenmajerica, 2-krat bireta, 25 ml [$\pm 0,025 \text{ mL}$], Analitska tehtnica [$\pm 0,001 \text{ g}$]

Priprava 0,1 M KOH

Najprej smo si pripravili 0,1 M raztopino KOH. V 250 mL merilno bučko smo do polovice nalili etanol, vanjo zatehtali 1,400 g KOH in do oznake nalili etanol. Vse smo dobro premešali in bučko ustrezno označili. Izračun: $m(\text{KOH}) = c \times M \times V = 0,1 \text{ mol/L} \times 56,1 \text{ g/mol} \times 0,250 \text{ L} = 1,401 \text{ g}$

Titracija vzorcev olja grozdnih pešk

1. V 200 mL erlenmajerico zatehtamo 0,5 – 1,0 g vzorca. Maso zapišemo v preglednico 21. Dodamo 50 mL topila etanol – toluen in dobro premešamo.
2. Dodamo indikator fenolftalein.
3. Bireto do oznake 0,0 mL napolnimo z 0,1M KOH.
4. Pod erlenmajerico postavimo bel list papirja.
5. Titriramo do preskoka barve iz brezbarvnega v rahlo (obstojno) vijolično barvo.
6. Titracijo smo izvedeli v 3. paralelkah.
7. Porabo KOH smo vpisali v preglednice 22–26.
8. V izračun vzamemo poprečno porabo KOH (v mL) za vsak vzorec.

4.6.1 Rezultati meritev

Preglednica 21. Mase olj za titracijo

Vzorec	masa, [$\pm 0,001 \text{ g}$] – 1. paralelka	masa, [$\pm 0,001 \text{ g}$] – 2. paralelka	masa, [$\pm 0,001 \text{ g}$] – 3. paralelka	Poprečna masa olja, [$\pm 0,002 \text{ g}$]
A	0,981	0,807	0,890	0,890
B	0,900	0,900	0,900	0,900
C	0,989	0,904	0,946	0,948
D	0,914	0,924	0,920	0,920
E	0,901	0,946	0,926	0,924

Preglednica 22. Titracija vzorca A

Vzorec	V(KOH), [± 0,025 mL] – 1. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 2. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 3. paralelka	Poprečna prostornina KOH [± 0,05 mL]
V ₂	0,800	1,150	1,800	0,67
V ₁	0,150	0,800	1,150	
Δ V	0,650	0,700	0,650	

Preglednica 23. Titracija vzorca B

Vzorec	V(KOH), [± 0,025 mL] – 1. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 2. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 3. paralelka	Poprečna prostornina KOH [± 0,050 mL]
V ₂	0,800	1,500	2,200	0,79
V ₁	0,150	0,800	1,500	
Δ V	0,650	0,700	0,700	

Preglednica 24. Titracija vzorca C

Vzorec	V(KOH), [± 0,025 mL] – 1. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 2. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 3. paralelka	Poprečna prostornina KOH [± 0,050 mL]
V ₂	3,000	3,700	4,300	0,70
V ₁	2,300	3,000	3,700	
Δ V	0,700	0,700	0,700	

Preglednica 25. Titracija vzorca D

Vzorec	V(KOH), [± 0,025 mL] – 1. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 2. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 3. paralelka	Poprečna prostornina KOH [± 0,050 mL]
V ₂	4,900	5,250	5,550	0,32
V ₁	4,600	4,900	5,250	
Δ V	0,300	0,350	0,300	

Preglednica 26. Titracija vzorca E

Vzorec	V(KOH), [± 0,025 mL] – 1. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 2. paralelka	V(KOH), [± 0,025 mL] – 3. paralelka	Poprečna prostornina KOH [± 0,050 mL]
V ₂	4,150	4,600	5,100	0,47
V ₁	3,700	4,150	4,600	
Δ V	0,450	0,450	0,500	

4.6.1 Izračun kislinskega števila (KŠ)

Primer izračuna kislinskega števila za vzorec A:

$$\text{KŠ (mg KOH/g olja)} = \frac{V(\text{KOH}) \times c(\text{KOH}) \times M(\text{KOH})}{m(\text{olja})} = \frac{0,67 \text{ mL} \times 0,1 \text{ mol} \times 56,1 \text{ g}}{\text{mol} \times 0,890 \text{ g} \times 1000 \text{ mL}} = 0,00422 \text{ (0,42 \%)}$$

Preglednica 27. Izračun kislinskega števila

Vzorec	KŠ (mg KOH/g olj)	%
A	0,00422	0,42
B	0,00492	0,49
C	0,00414	0,41
D	0,00195	0,20
E	0,00285	0,29

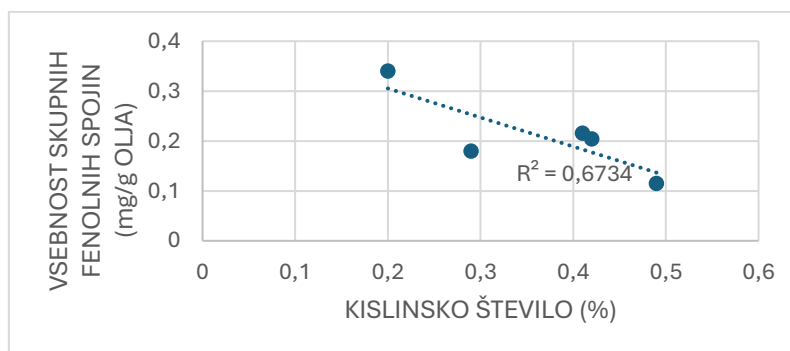
Iz preglednice 27 vidimo, da vsi vzorci ustrezajo Pravilniku o kakovosti rastlinskega olja, rastlinske masti in majoneze (Ur. l.RS 99/22; v nadaljevanju pravilnik), ki v svojem 16. členu pravi, da morajo hladno stiskana olja iz grozdnih pešk, pridobljena iz pešk grozdja (*Vitis vinifera L.*) vsebovati največ 2 % prostih maščobnih kislin⁹. Vsa naša olja niso imela enake rumene barve, vendar vsa vsebujejo bistveno nižje vrednosti prostih maščobnih kislin kot je zgornja meja v pravilniku. Napaka meritev, ki je predstavljena v poglavju 4.6.2 pokaže, da eksperimentalna napaka ne vpliva na interpretacijo rezultatov; vsa olja so še vedno krepko pod 2 % prostih maščobnih kislin.



Slika 11. Vzorci pred titracijo (levo) in ob ekvivalentni točki (desno) (lasten vir)

4.6.2 Korelacija med vrednostjo skupnih fenolnih spojin in prostih maščobnih kislin

Na grafu 11 smo združili podatke za vrednost skupnih fenolnih spojin in kislinska števila OGP.



Graf 11. Korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in kislinskim številom hladno stiskanih olj grozdnih pešk

⁹ Pravilnik navaja, da so proste maščobne kisline izražene kot oleinska kislina.

$$\text{Korelacijski faktor} = \sqrt{0,6734} = 0,82$$

Kot vidimo iz izračuna korelacijskega faktorja je korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in kislinskim številom hladno stiskanih olj grozdnih pešk visoka (0,82) in sklepamo lahko na tesno povezanost obeh dejavnikov oz. teh dveh lastnosti olj.

5 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

Raziskave smo se lotili, ker izhajamo iz zelo vinorodnega okoliša, kjer bi bila pridelava OGP lahko zelo zanimiva, saj so tudi količine grozdja, ki ga pridelamo, velike. Pridelava bi bila zanimiva tako z okoljskega kot ekonomskega vidika, saj s tem zmanjšujemo količino odpadkov in pridobivamo zdravju zelo koristne snovi.

V **hipotezi ena** smo predpostavili, da bo antioksidativna učinkovitost hladno stiskanih OGP v povprečju višji kot antioksidativna učinkovitost vzorcev hladno stiskanih oljčnih olj. Ta hipoteza **se je izkazala za pravilno**, saj so hladno stiskana olja grozdnih pešk pokazala za cca. 30 % višjo zmožnost inhibicije radikala DPPH. Predpostavljamo, da olje grozdnih pešk očitno spremlja višja vsebnost antioksidantov zaradi potrebe po zaščiti oksidativno bolj izpostavljenih maščobnih kislin. Vrednosti inhibicije DPPH radikala, izražene v odstotkih, so se v povprečju, po 10. minutah, gibale okoli 70 % pri oljih grozdnih pešk in le 40 % pri oljčnih oljih. Resveratrol je bil med vsemi preučeni vzorci edina čista snov, s stopnjo inhibicije DPPH radikala 80 %. S tem smo **potrdili tudi hipotezo tri**, kjer smo predpostavili, da bo OGP imelo visoko antioksidativno učinkovitost, vendar bo čisti resveratrol deloval močnejše.

V **hipotezi dve** smo predvidevali, da bo vsebnost skupnih fenolnih spojin med posameznimi olji grozdnih pešk različna. Ta hipoteza se je **izkazala za pravilno**. Skupna vrednost fenolnih spojin v oljih, določena s F-C metodo, se je gibala 0,115 mg/g olja–0,340 mg/g olja. Te vrednosti so bile sicer nižje od vrednosti, ki so jih določili drugi raziskovalci, kar pripisujemo dejstvu, da fenolnih spojin predhodno nismo ekstrahirali.

Preučili smo tudi, ali obstaja korelacija med AOU hladno stiskanimi olji grozdnih pešk in vsebnostjo polifenolov v njih. Ugotovili smo, da se korelacijski faktorji gibljejo 0,74–0,90 kar pomeni (zelo) visoko korelacijo in tesno povezanost. S tem smo **potrdili tudi hipotezo štiri**, kjer smo predvidevali, da obstaja srednje visoka korelacija med AOU in vsebnostjo polifenolov

pri olju grozdnih pešk. Predvideli smo, da bo korelacija višja od 0,41, kar se je izkazalo za pravilno.

V **hipotezi pet** smo predvideli, da bo vsebnost prostih maščobnih kislin v oljih grozdnih pešk nizka (manj kot 2 %). Izkazalo se je, da so vrednosti kislinskih števil ali nevtralizacijskega števila nizke, v razponu 0,20–0,49 %. S tem je **potrjena je tudi hipoteza pet**. Korelacijski faktor med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in kislinskim številom je bil ponovno visok – 0,82, kar kaže na visoko stopnjo povezanosti. Trigliceridi, kjer so vezane maščobne kisline, so v veliki meri ostali stabilni in v letu dni ni prišlo do njihove hidrolize ali oksidacije.

Najbolj zanimiva vzorca sta bila vzorec D, ki je v vseh treh kvantitativnih analizah pokazal najboljše lastnosti ter vzorec E, ki je kazal najnižjo sposobnost inhibicije DPPH radikala, nizko vrednost skupnih fenolnih spojin, vendar tudi nizko kislinsko število. Predvidevamo lahko, da se je del antioksidantov (npr. polifenolov) v vzorcu E že oksidiral, vendar je olje še vedno ohranjalo svojo visoko kakovost, izkazano skozi nizko vrednost kislinskega števila, kar je lahko dokaz, da so ta olja lahko odlični konzervansi tako za živilske kot farmacevtske proizvode. Zavedamo se, da bi za to trditev potrebovali še dodatne analize, ki jih navajamo v poglavju 5.1.

5.1 Omejitve raziskave in dopolnitve

Glavna pomanjkljivost te raziskave je malo vzorcev olj, zato je rezultate težko posploševati. V kraju, kjer živimo, je registriranih 25 proizvajalcev vin in samo pet le-teh občasno iz tropin izloči grozdnje peške in ji preda v hladno stiskanje. Večina pravi, da so proizvodni stroški višji kot je dobiček, saj večjega zanimanja za odkup teh olj po realni ceni (še) ni. Zato je to obenem tudi velika tržna niša. Druga pomanjkljivost so tehnike dela, ki so nam bile na voljo v šolskem laboratoriju. Kljub natančnosti pri delu, ponavljanju meritev in meritvah istega vzorca v več ponovitvah (paralelkah), so rezultati odstopali od meritev, ki so jih dobili drugi raziskovalci. Kot dopolnitev bi v prihodnje poskušali narediti še izolacijo fenolnih spojin iz olj, določiti peroksidno število in jodno število ter IR spektroskopijo, da bi dobili vpogled v sestavo različnih preiskovanih olj. Zanimiva bi bila tudi izdelava izdelka iz olj grozdnih pešk. Prvi kandidat je vzorec D, ki se je v meritvah izkazal za najbolj kvalitetnega. Krema za roke, bogata z olji in antioksidanti, bi morda lahko bila nadgradnja, ki bi spodbudila naše vinarje, da grozdnih pešk ne bi zavrgli.

7 VIRI

Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2007, 2, str. 875–877.

Ally, A.I., Horrobin, D.F. (1980). Thromboxane A₂ in blood vessel walls and its physiological significance: relevance to thrombosis and hypertension. *Prostaglandins and Medicine*, 4, 6: str. 431-438

Aktumsek, A.; Zengin, G.; Guler, G.O.; Cakmak, Y.S.; Duran, A. (2011) Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea L.* species from Turkey flora. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, str. 2914–2920

Azzi (2007). "Molecular mechanism of alpha-tocopherol action". *Free radical biology & medicine* 43 (1): str. 16–21

Blainski, A., Lopes, G.C., Palazzo De Mello, J. C. (2013) . Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense L.* *Molecules* 2013, 18(6), 6852-6865; <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>

Butinar, B., M. Bučar-Miklavčič, Lipnik_štangel, M. (2006). Antioxidants in virgin olive oils produced from two olive cultivars of Slovene istria. *Annales, Ser. Hist. Nat.*, 16 (2), str. 201-206.

Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 2: 324-325

Di Stefano, V., Buzzanca, C., Melilli, M.G., Indelicato, S., Mauro, M., Vazzana, M., Arizza, V., Lucarini, M., Durazzo, A., Bongiorno, D. (2022). Polyphenol Characterization and Antioxidant Activity of Grape Seeds and Skins from Sicily: A Preliminary Study. *Sustainability* 2022, 14, str. 6702. Dostopno na: <https://doi.org/10.3390/su14116702>
Povzeto 20. 12. 2024.

Dimić I., Putnik P., Teslić N., Bursać-Kovačević D. (2020). Innovative and conventional valorizations of grape seeds from winery by-products as sustainable source of lipophilic antioxidants. *Antioxidants*, 9, 7: 568, doi: 10.3390/antiox9070568: str. 19

Freitas, L. S., Dariva, C., Jacques, R. A., Caramão, E. B. (2013). Effects of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of brazilian grape seed oil. *Separation and Purification Technology*, 116, 15: str. 313-318

García-Rodríguez, R. , Romero-Segura, C., Sanz. C., Sánchez-Ortiz, A. (2011) Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, Volume 44, Issue 2, March 2011, str. 629-635

Grobiša. A. (2017). Fenolne spojine v oljki in oljčnem olju. Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Diplomsko delo.

- Ilknur, D., Ebru, P., Ibrahim, S. Ö, Alasalvar C., Ertas E. (2013). Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 6: str. 641-647
- Kaur, A. s sod (2022). Therapeutic Aspects of Resveratrol - Agent with Multiple Health. Benefits *Drug Res* 2022; 72: str. 5-17
- Kopač, N. (2016). Razvoj metode za vrednotenje rastlinskih olj z IR spektroskopijo. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo.
- Koron, E. (2023). Vsebnost polifenolov v olju grozdnih pešk. Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo. Univerza v Novi Gorici. Diplomsko delo.
- Leonard, S.R, Young, B., L., Mayville, F.,C. (2024). Extraction and Analysis of the Antioxidant Resveratrol from Various R.W. Knudsen Family Juices. *Journal of Undergraduate Chemistry Research*, 2024, 23(3), str. 13
- Matthäus, B. (2008). Virgin grape seed oil: is it really a nutritional highlight? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 7: str. 645-650
- Mettler Toledo (2024). UV-Vis spektroskopija: Osnovno znanje Dostopno na: https://www.mt.com/si/sl/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/uv-vis-spectrometers.html Povzeto: 30. 12. 2024
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2000). *Lehninger, Principles of Biochemistry* (3rd ed.). New York: Worth Publishing. ISBN 1-57259-153-6.
- Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj, jedilnih rastlinskih masteh in majonezi. Uradni list RS, št. 79/09, 94/09 – popr., 26/14 – ZKme-1B in 99/22
- Romanini, E., McRae, J.M., Bilogrević, E., Colangelo, D., Gabrielli, M., Lambri, M. (2021). Use of grape seeds to reduce haze formation in white wines. *Food Chemistry*, 341: 128250, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128250: str. 8.
- Rombaut ,N., Saviore, R., Thomasset, B., Bélliard, T., Castello, J., Van Hecke, É., Lanoisellé, J.L. (2014). Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*, 17, 3: str. 284-292
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Castello, J., Van Hecke, E., Lanoisellé, J. L. (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. *Industrial Crops and Products*, 63: str. 26-33
- Ryan, L., Coe, M., Fraser, N. (2013) Polyphenol Bioaccessibility and Sugar Reducing Capacity of Black, Green, and White Teas .*International Journal of Food Science*, January 2013 (2).DOI:10.1155/2013/238216
- Santa-María, C. (2023) Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients*. doi.org/10.3390/nu15010224.

Sadeer, N. B., Montesano, D., Mahomoodally, M.F. (2020) The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*. Dostopno na: <https://www.researchgate.net/publication/34344487> Uporabljeno: 23. 11. 2024

Sánchez-Rangel, J.C.; Benavides, J.; Heredia, J.B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* 2013, 5, str. 5990–5999.

Schwitters, Bert (1995). *OPC in Practice*. p. 15. ISBN 978-8886035132.

Sharifi M., Bashtani M., Naserian A.A., Farhangfar H., Rasani M., Emami A. (2018). Grape seed oil supplementation in lamb diet: effect on meat oxidation stability and muscle fatty acids. *Italian Journal of Animal Science*, 18, 1: str. 1302-1309

Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., Lynn, P. Y. (1998). Nature of polyphenol- protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1: str. 80-85

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Volume 299, 1999, str. 152-178

Slokar, N. (2010). Kvantitativna in kvalitativna analiza fenolnih spojin antioksidativni učinek ekstraktov oljčnega olja. Diplomsko delo. BTF UL.

Statistični urad RS (2024). <https://stat.si/StatWeb/News/Index/9568> Povzeto 1. 1. 2025

SURS. (2024). Popis vinogradov, Slovenija, 2020. Ljubljana, Statistični urad RS Dostopno na: <https://www.stat.si/StatWeb/news/Index/9568> (Povzeto 1.1. 2025)

SURS. (2021). Povprečni pridelek (t/ha) pomembnejših kmetijskih kultur, po statističnih regijah, Slovenija, letno. Ljubljana, Statistični urad RS: baza podatkov Dostopno na: <https://pxweb.stat.si/SiStatData/pxweb/sl/Data/-/1502410S.px> Povzeto 1. 1. 2025

Trček, S. (2022). Parametri kakovosti olj grozdnih pešk. Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2022.

ZRS Koper (2019). Smernice za trajnostno uporabo ostankov proizvodnje v oljkarstvu, Dostopno na: <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-Q4K7PG7E/5726000b-bff3-4e05-afea-efbda1604305/PDF> Povzeto 2. 1. 2025.

Veberič, R. (2025). Sadje in fenolne snovi. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana. Dostopno na: <https://sadjar.si/sadje-in-fenolne-snovi-robot-veberic/> Povzeto 5. 1. 2025.

World Cancer Research Fund (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective* Arhivirano 2015-09-23 na Wayback Machine... ISBN 978-0-9722522-2-5.