

Vilniaus universitetas  
Fizikos fakultetas  
Lazerinių tyrimų centras

Povilas Zdanis  
**NATŪRALIŲ PIGMENTŲ, ESANČIŲ YPAČ TYRAME ALYVUOGIŲ ALIEJUJE,  
FOTOTRANSFORMACIJŲ SPEKTROMETRINIAI TYRIMAI**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Biofizikos studijų programa

Studentas

Povilas Zdanis

Leista ginti

2018-05-30

Darbo vadovas

Prof. Dr. S. Bagdonas

LTC direktorius

Prof. Dr. R. Gadonas

Vilnius 2018

## **Turinys**

Įvadas .....	3
1. Literatūros apžvalga ir teorinis įvadas .....	4
1.1. Energijos pernašos būdai .....	4
1.2. Lamberto–Bugerio–Bero dėsnis .....	5
1.3. Spektrofotometrija .....	6
1.4. Fluorescencijos spektroskopija .....	7
1.5 Fotosensibilizacijos reiškinytis .....	9
1.6 Fotosensibilizacijos reakcijos .....	9
1.7 Sensibilizatorių fotostabilumas ir fototransformacijos .....	11
1.8 Fotosensibilizacijos poveikis biomolekulėms .....	12
1.9 Ypač tyras alyvuogių aliejus .....	12
2. Eksperimentinė dalis .....	16
2.1. Prietaisai, naudoti šiame darbe .....	16
2.2. Tiriamos medžiagos .....	18
2.2.1 Chlorofilai .....	18
2.2.2 Feofitinas .....	18
2.2.3 Karotinai .....	19
2.2.4 Nesočiosios riebalinės rūgštys .....	19
2.3. Darbo metodika .....	20
2.3.1. Bandiniai .....	20
2.3.2 Blukimo matavimai .....	20
2.3.3 Fluorescencija .....	21
2.3.4 Skirtingos švitinimo sąlygos .....	21
2.3.5 Fluorescencijos spektrų koregavimas .....	21
2.3.6 Duomenų analizė .....	23
3. Rezultatai ir jų aptarimas .....	24
3.1 YTAA sudėtis ir fotovirsmas .....	24
3.2 Skirtingos švitinimo sąlygos ir oksidaciniai produktai .....	27
3.3 Fotocheminių reakcijų, vykstančių YTAA, mechanizmas .....	29
Išvados .....	30
Literatūros šaltinių sąrašas .....	31
Santrauka .....	34
Summary .....	35

## **Įvadas**

Ypač tyras alyvuogių aliejus (YTAA) yra gaminamas iš alyvmedžių (lot. olea europaea) uogų, dėl to jame yra didelis kiekis nesočiųjų riebalinių rūgščių ir biologiškai aktyvių molekulių. Tarp skirtingų augalinių aliejų rūšių ypač tyras alyvuogių aliejus turi didžiausią bioaktyvių medžiagų kiekį (apie 2%), dėl šių priežasčių alyvuogių aliejus yra laikomas sąlyginai aukštesnės kokybės nei kiti augaliniai aliejai [1, 2].

Alyvuogių aliejaus kokybė priklauso nuo įvairių faktorių: regiono, kur auginamos alyvuogės, vaisių prinokimo lygio, sandėliavimo, apdorojimo ir kt. Tinkamos alyvuogių aliejaus laikymo sąlygos yra labai svarbios, nes netinkamas laikymas ar sandėliavimas gali paveikti aliejaus skonį, jis gali tapti kartus ir pradėti gesti, o tai gali turėti neigiamą poveikį jo maistinei vertei. Tinkamai laikomas alyvuogių aliejus gali išlikti nepakitęs kelis metus [3,4].

Tinkamos laikymo sąlygos gali apsaugoti aliejų nuo oksidacinių procesų. Oksidacija alyvuogių aliejuje daugiausia vyksta dėl degradavimo hidrolizės būdu, auto- ir foto- oksidacijos [5]. Šie procesai priklauso nuo riebalinių rūgščių struktūros ir nuo aliejuje esančių bioaktyvių medžiagų [6]. Tokios bioaktyvios medžiagos kaip fosfolipidai, tokoferoliai, karotinoidai ir chlorofilai gali veikti kaip anti- arba pro- oksidantai, dėl to gali kisti alyvuogių aliejaus oksidacinis stabilumas [7]. YTAA galima rasti natūralių fotosensibilizatorių, kaip chlorofilų ar jų darinių. Šie sensibilizatoriai yra pagrindinė priežastis, dėl kurios aliejuje vyksta fotooksidacija, o jame esantys antioksidantai ( $\beta$ -karotinas, luteinas) kuria apsauginį efektą [8, 9].

Dėl didelio kiekio natūralių antioksidantų ir kitų žmogaus organizmui naudingų medžiagų YTAA kaina yra sąlyginai didesnė palyginus su kitais augaliniiais aliejais. YTAA metinė vertė yra apie 11 mlrd. USD. Dėl šių priežasčių yra žinoma nemažai YTAA klastojimo atvejų. Į augalinius aliejus (pavyzdžiui, rapsų aliejų) yra pridedama dažiklių ir skonio stipriklių, kad suteiktų jiems tamsesnę spalvą ir panašų skonį į ypač tyro alyvuogių aliejaus. Taip pat ypač tyras alyvuogių aliejus yra skiedžiamas kitu augaliniu aliejumi [10].

Šio darbo tikslas yra išsiaiškinti, kokie fotovirsmai vyksta ypač tyrame alyvuogių aliejuje natūraliai esančius fotosensibilizatorius paveikus šviesa. Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti uždaviniai:

- Nustatyti, kokie spektriniai pokyčiai vyksta ypač tyrame alyvuogių aliejuje, jį paveikus šviesa;
- Išsiaiškinti, kokios reakcijos vyksta ypač tyrame alyvuogių aliejuje, jį paveikus šviesa ir jo senėjimo metu.

# 1. Literatūros apžvalga ir teorinis įvadas

## 1.1. Energijos pernašos būdai

Kiekvienai molekulei ar atomui yra būdinga tam tikrų energinių lygmenų sistema. Šuoliai tarp lygmenų vyksta molekulems sugėrus arba išspinduliuavus energijos porciją. Medžiagos gebėjimas sugerti tam tikro bangos ilgio šviesą priklauso nuo įvairių jos savybių, tokių kaip cheminė sandara, cheminiai ryšiai tarp atomų ir medžiagos sudėtis. Molekulių elektronų žadinimo energijos yra labai įvairios. Tas energijas lemia, ar elektronas yra vidinėje ar išorinėje orbitalėje, ar jis sudaro ryšį tarp atomų ar ne, koks tų ryšių pobūdis ir jų tarpusavio padėtis. Lengviausiai sužadunami yra išoriniame energiniame lygmenyje esantys elektronai — valentiniai elektronai. Jiems sužadinti užtenka ultravioletinės ar regimosios spinduliuotės fotonų energijos. Jablonskio diagrama yra energijos lygmenų diagrama, kurioje galima pažymėti elektronų šuolius bei spindulinius ir nespindulinius vyksmus (1.1 pav.).

Kambario temperatūroje beveik visos molekulės yra pagrindinėje būsenoje. Sužadinus molekulę elektronas iš aukščiausio užpildyto lygmens pereina į aukščiau esantį neužpildytą lygmenį. Taip dalelė įgauna perteklinės energijos, kuri yra perduodama aplinkai, kai elektronas grįžta į pagrindinę būseną. Diagramoje yra sužymėti galimi elektronų šuoliai ir energijos atidavimo būdai. Singuletinius (S) bei tripletinius (T) energinius lygmenis diagramoje vaizduoja storos linijos, o plonos linijos rodo kiekvieno lygmens vibracinius polygmenis [11,12].

Sugertis — procesas, kai molekulei sugėrus šviesos fotoną elektronas peršoka iš aukščiausio užpildyto energinio lygmens į aukštesnį neužpildytą lygmenį, kurio energija yra didesnė nei užpildyto lygmens ( $S_0 \rightarrow S_1, S_2$ ). Vyksmo trukmė  $10^{-15}$  s.

Virpesinė relaksacija — vyksmas, kai sužadintos molekulės elektronas peršoka iš aukštesnių energijos lygmenų į žemiausią sužadinto energinio lygmens polygmenį, aplinkai atiduodamas energiją šiluminiu pavidalu. Vyksmo trukmė  $10^{-14} - 10^{-11}$  s.

Vidinė konversija — nespindulinis šuolis tarp skirtingų energinių lygmenų, atiduodantis aplinkai energiją šiluminiu pavidalu ( $S_1 \rightarrow S_2$ ). Vyksmo trukmė  $10^{-14} - 10^{-11}$  s.

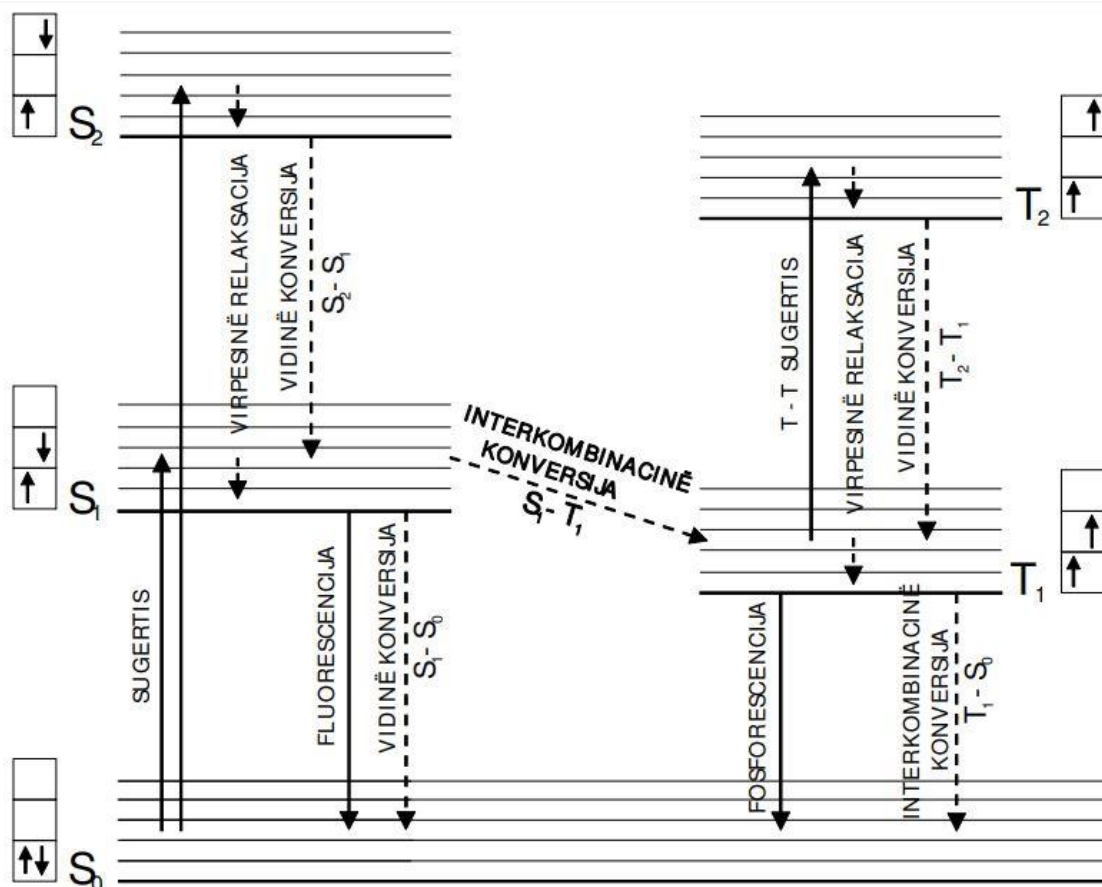
Interkombinacinė konversija — elektrono šuolis iš singuletinės būsenos į tripletinę, kurio metu elektronas pakeičia savo sukinį ( $S_1 \rightarrow T_1$ ). Vyksmo trukmė  $10^{-8} - 10^{-3}$  s.

Fluorescencija — molekulės grįžimas į pagrindinę būseną išspinduliuojant fluorescencijos fotoną ( $S_1 \rightarrow S_0$ ). Vyksmo trukmė  $10^{-9} - 10^{-7}$  s.

Fosforescencija — molekulės grįžimas iš tripletinės būsenos ( $T_1$ ) į pagrindinę išspinduliuojant fosforescencijos fotoną ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). Vyksmo trukmė  $10^{-4} - 10^{-1}$  s.

Perteklinė energija, gauta sugerties metu, molekulėje gali inicijuoti įvairius fotofizikinius, fotocheminius ir fotobiologinius vyksmus. Šios perteklinės energijos inicijuotų relaksacijų bei

šuolių tyrimai suteikia daug naudingos informacijos apie biomolekulių struktūrą bei vyksmus, vykstančius jose [12].



1.1 pav. Daugiaatomės molekulės energijos lygmenų diagrama [5]

## 1.2. Lamberto–Bugerio–Bero dėsnis

Pasinaudojus bandinio sugerties matavimo eksperimentu galima aprašyti šviesos sugertį nusakančius dėsnius. Kiuvetė su tirpalu yra apšviečiama monochromatine šviesa, kurios intensyvumas yra  $I_0$ . Jeigu tirpalas sugers dalį šviesos, tai šviesos intensyvumas  $I$  praėjęs tirpalą sumažės. Santykis  $T = I_0/I$  yra vadinamas tirpalo pralaidumu. Dar vienas parametras, apibūdinantis tirpalo sugertį, yra sugerties koeficientas  $A$ :

$$A = 1 - T; \quad (1.1)$$

Praėjusios šviesos intensyvumui įtaką daro tiek tirpale esančių ir sugeriančių šviesą molekulių koncentracija  $n$  [ $cm^{-3}$ ], tiek šviesos nueitas kelias  $l$ . Taip pat molekulės yra apibūdinamos efektyviu šviesos pagavos skerspjūviu  $S$  [ $cm^2$ ]. Taigi išskiriant bandinyje  $1\ cm^2$  plotą ir mažą sluoksnį  $dl$  galima apskaičiuoti pradinio šviesos intensyvumo  $I_0$  pokytį sluoksnyje  $dl$ :

$$dI = -I_0 \cdot S \cdot n \cdot dl; \quad (1.2)$$

čia minusas žymi, kad intensyvumas mažėja. Sugertos ir kritusios šviesos santykis bus:

$$dI/I_0 = -S \cdot n \cdot dl; \quad (1.3)$$

Suintegravus visame bandinio plote gaunama:

$$\ln(I/I_0) = -S \cdot n \cdot l; \quad (1.4)$$

$$I/I_0 = e^{-S \cdot n \cdot l} = T. \quad (1.5)$$

Vienalytėse sistemose šviesos sugertį aprašo Bugerio dėsnis:

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot l}; \quad (1.6)$$

čia  $k$  yra sugerties koeficientas. Aprašant šviesos sugerties vyksmą molekulinėse sistemose, yra naudojama sugerties statistinė tikimybė –  $\sigma$ . Sugerties tikimybė vienai molekulei yra vadinama sugerties skerspjūviu:

$$\sigma = k/n. \quad (1.7)$$

Šviesos sugertį silpnai sugeriančių pigmentų tirpaluose aprašo Lamberto–Bugerio–Bero dėsnis:

$$I = I_0 \cdot e^{-\sigma \cdot n \cdot l}. \quad (1.8)$$

Dažnai, kad būtų patogiau skaičiuoti, yra naudojami dešimtainiai logaritmai:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}; \quad (1.9)$$

čia  $c$  – medžiagos, esančios tirpale, koncentracija,  $l$  – optinis kelias,  $\varepsilon$  – ekstinkcijos koeficientas [11].

### 1.3. Spektrofotometrija

Daugelis biologiškai aktyvių molekulių pasižymi specifine sugertimi regimajame, ultravioletiniame ir infraraudonajame spektriniame ruože. Analizės metodai, tiriant medžiagos savybę sugerti optinio ruožo spinduliuotę, vadinami spektrofotometriniais metodais. Tiriant medžiagas yra naudojama kokybinė ir kiekybinė analizė. Kokybinė analizė yra tuomet, kai kiekviena molekulė turi charakteringą sugerties spektrą. Kiekybinė analizė yra paremta Lamberto–Bugerio–Bero dėsniu, kad molekulių sugertis nuo koncentracijos priklauso tiesiškai ir galioja sugerties adityvumas. Nuo spektrofotometrijos dėsnio gali būti nukrypstama dėl įvairių priežasčių: solvatacijos, hidrolizės, kompleksinių junginių susidarymo, tarpinių produktų susidarymo, polimerizacijos ir kt. [11].

Spektrofotometrijoje yra matuojamas sugerties spektras – tai biologinio objekto optinio tankio priklausomybė nuo šviesos bangos ilgio. Tirpalo optinis tankis priklauso nuo tiriamos medžiagos koncentracijos, bandinio storio ir ekstinkcijos koeficiento. Sugerties spektrą įprasta normuoti, o kadangi ekstinkcijos koeficientas yra kiekvienai medžiagai skirtingas, tai ir sunormuotas spektras bus individualus kiekvienai medžiagai.

Spektrofotometras lygina pradinės šviesos intensyvumą su šviesos, kuri praėjo bandinį, intensyvumu: pirmiausiai išmatuojamas spektrofotometro lempos spektras, paskui įdėjus bandinį

yra išmatuojamas tas pats lempos spektras, tačiau bandinys dalį šviesos sugėrė, todėl spektras kitoks. Pralaidumo spektras yra gaunamas pradinį spektrą dalinant iš bandinio spektro. Prietaisais tiesiogiai nematuoja sugerties spektrų, jis tik matematiškai apskaičiuoja jį:  $A = \log_{10}(2 - T)$ .

#### 1.4. Fluorescencijos spektroskopija

Šviesos emisijos vyksmas yra labai informatyvus tiriant bioobjektus, biostruktūras ir pačiame objekte vykstančius procesus. Emisija dar yra žinoma kaip liuminescencija, kuri gali būti nusakoma dviem spinduliavimo būdais — fluorescencija ir fosforescencija. Sužadintoje būsenoje molekulė yra nestabili, todėl elektronas grįžta į būseną su mažiausia energija, taip atiduodamas aplinkai perteklinę energiją, ją transformuodamas į vibracinę ir/ar rotacinę energiją arba išspinduliuodamas ją šviesos kvantu t.y. liuminescuodamas [11].

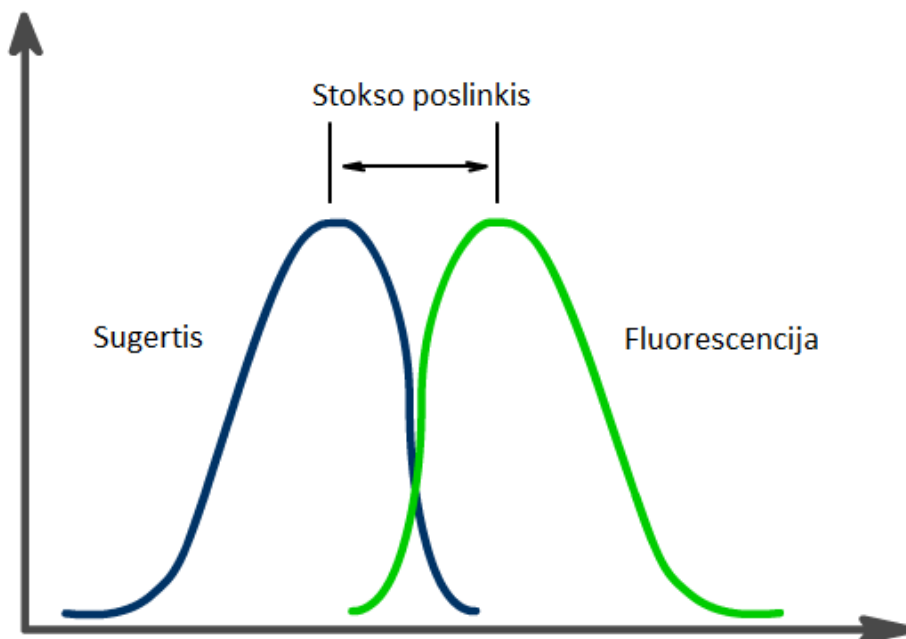
Tyrinėjant liuminescencijos spektrus buvo pastebėta, kad švytėjimas fluorescencijos srityje kartais užsidelsia iki 10 s. Tai vadinama uždelstąja fluorescencija. Šis procesas vyksta, kai elektronas iš sužadintos singuletinės būsenos peršoka į tripletinę būseną, o iš ten grįžta atgal į singuletinę dėl temperatūrinės aktyvacijos, po to relaksuodamas į  $S_0$  būseną išspinduliuoja fluorescencijos fotoną [13].

Fluorescencijos spektro intensyvumas dažniausiai nepriklauso nuo žadinančios bangos ilgio. Taip yra dėl to, kad molekulė fluorescuoja iš konkrečios būsenos, kuri nepriklauso nuo žadinimo. Jei molekulės sužadintas elektronas peršoka į aukštesnius lygmenis, pvz.,  $S_2$ , tai elektronas nespinduliniu būdu peršoks į žemiausią galimą sužadintą būseną  $S_1$ , tada jis arba vidinės konversijos arba fluorescencijos būdu pereis į žemiausią elektroninės būsenos polygmenį. Fluorescencija nevyksta iš aukštesnių sužadintų elektroninių lygmenų (išskyrus retas išimtis). Spindulinio šuolio tikimybė priklauso nuo energijos tarpo  $\Delta E$  tarp lygmenų. Tarp aukštesnių elektroninių lygmenų tarpas mažėja – tai sąlygoja didesnę nespindulinio šuolio tikimybę, dėl to aukštesniuose lygmenyse yra galimi tik nespinduliniai šuoliai [14].

Buvo pastebėta, kad apšvietus fluoritą jis išspinduliuoja ilgesnių bangų šviesą. Dėl to fluorescencijos spektras pasislenka į ilgesnių bangų sritį sugerties spektro atžvilgiu. Tai pirmasis pastebėjo G. G. Stokes, jo vardu ir buvo pavadintas šis poslinkis (1.2 pav.). Pagrindinė šio poslinkio priežastis yra ta, kad, relaksacijos metu vykstant vidinei konversijai, dalis sužadintos molekulės energijos yra atiduodama aplinkai šiluminės energijos pavidalu, dėl to fluorescencijos metu išspinduliuoto fotono energija yra mažesnė už energiją, kurią gavo sugerties metu.

Fluorescencijos spektroskopija – tai fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų matavimų metodas. Šis metodas padeda įvertinti fluorescencijos spektro intensyvumą, formą bei gyvavimo trukmę ir yra naudojamas įvairiems diagnostikos tyrimams.

Skirtingos molekulės sugeria šviesą skirtinguose režiuose. Kad būtų gautas fluorescencijos spektras, molekulė yra žadinama tokia šviesos ilgio banga, kurią ji sugeria geriausiai. Fluorescencijos spektras yra matuojamas visame emisijos intervale žadinant tik konkretaus ilgio šviesos banga. Šis spektras parodo fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo tam tikro bangos ilgio. Kartais daroma atvirkščiai – matuojamas fluorescencijos žadinimo spektras, keičiant žadinimo bangos ilgį esant fiksuotam fluorescencijos bangos ilgiui.



**1.2 pav.** Stokso poslinkį vaizduojantys fluorescencijos ir sugerties spektrai

Molekulės išspinduliuotas šviesos fotonas turi specifines savybes, kurios priklauso nuo tos molekulės aplinkos ir pavidalų. Dėl to fluorescencijos matavimai suteikia daug informacijos apie tiriamą objektą, jo sudėtį bei struktūrą. Fluorescencijos gyvavimo trukmė ir jos kvantinis našumas taip pat gali suteikti daug informacijos [15].

Fluorescencijos gyvavimo trukmė  $\tau$  – tai laikas, kurį molekulė būna savo sužadintoje būsenoje. Ši būseną priklauso nuo fluorescencijos gesimo būdų. Fluorescencijos gesimas yra eksponentinis, kur  $I$  yra jos intensyvumas:

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (1.10)$$

čia  $I_0$  – pradinis fluorescencijos intensyvumas,  $k$  – greičio konstanta, kuri nusako intensyvumo silpnėjimą.

Greičio konstanta susideda iš spindulinės  $k_{sp}$  ir nespindulinės  $k_{nesp}$  konstantų, kurios yra atvirkščiai proporcingos jų gyvavimų trukmėms  $\tau_{sp}$  ir  $\tau_{nesp}$ :

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_{sp}} + \frac{1}{k_{nesp}} = \tau_{sp} + \tau_{nesp} \quad (1.11)$$



Fluorescencijos kvantinis našumas  $\varphi_{kv}$  – tai per tam tikrą laiką išspinduliuotų  $N_{fl}$  ir sugertų  $N_s$  fotonų santykis [13]:

$$\varphi_{kv} = \frac{N_{fl}}{N_s} \quad (1.12)$$

### 1.5 Fotosensibilizacijos reiškinys

UVC ir UVB spinduliuotės gali sukelti tiesiogines biologinių molekulių pažeidimus, nes biomolekulės šiose srityse šviesą sugeria geriausiai ir šios spinduliuotės energijos užtenka, kad būtų inicijuotos biomolekulių fotopažeidimai. Tuo tarpu UVA ir regimosios srities spinduliuotės biomolekulės sugeria mažai ir šios spinduliuotės dažniausiai fotopažeidimų neinicijuoja. Tačiau, jei aplinkoje yra fotosensibilizatorių, jos gali inicijuoti tolimesnius vyksmus, iš ko seka, kad biomolekulės gali būti pažeistos ir šių spinduliuočių. Tai vyksta, kai donoras (fotosensibilizatorius) sugeria šviesą ir įgautą perteklinę energiją perduoda aplinkinėms molekulėms (akceptoriams). Taip akceptorinė molekulė atsiduria sužadintoje būsenoje, kurioje gali dalyvauti įvairiose fotocheminėse reakcijose.

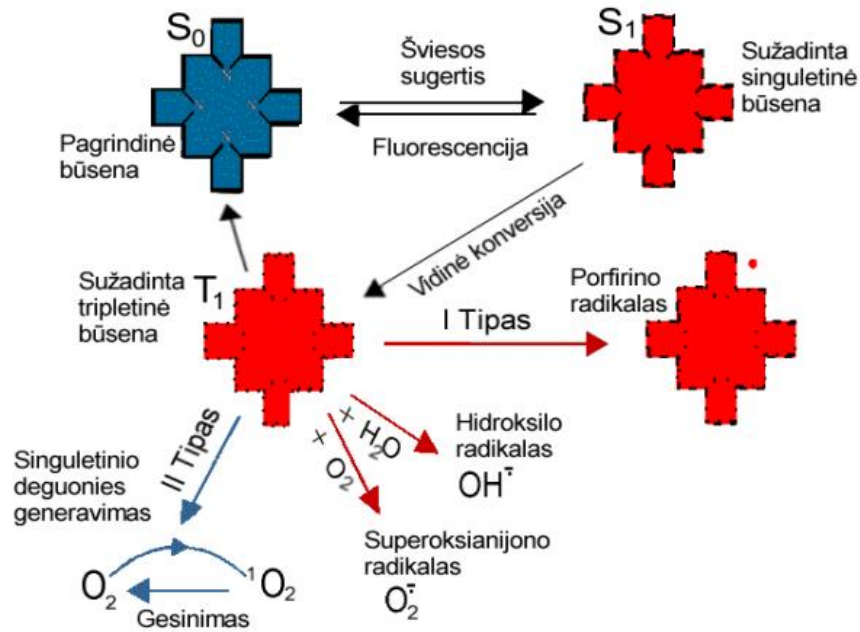
Ne visos molekulės, kurios sugeria šviesą, taip pat yra ir fotosensibilizatoriai. Kad molekulės patektų į fotosensibilizatorių kategoriją, jos turi turėti santykinai ilgą sužadintos būsenos gyvavimo trukmę, kuri užtikrintų efektyvią energijos pernašą aplinkinėms molekulėms. Efektyviausi fotosensibilizatoriai yra molekulės, kurios turi didelį interkombinacinės konversijos į sužadintą į tripletinę būseną kvantinį našumą ir ilgą tripletinės būsenos gyvavimo trukmę.

Fotosensibilizatoriais gali būti įvairūs organiniai, metalorganiniai ir neorganiniai junginiai, kai kurie sensibilizatoriai yra susintetinami organizme, ypač augaluose. Pavyzdžiui, fotosensibilizatoriams yra priskiriami kai kurie alkaloidai, chlorofilai, porfirinai, chinonai ir kt. Tačiau ne visos molekulės, kurios sugeria šviesą, yra efektyvūs fotosensibilizatoriai dėl to, kad jos neturi didelio kvantinio našumo, pvz., antocianinai, geležį turintys porfirinai ir kt. [11].

Sugėrusi šviesos fotoną sensibilizatoriaus molekulė iš pagrindinės būsenos sužadinama į sužadintą singuletinę būseną. Ši būseną gyvuoja labai trumpai, todėl yra laikoma, kad per tą laiką fotodinaminis poveikis neįvyks. Sužadintos singuletinės būsenos energija gali būti išsklaidyta arba išspinduliuojant fluorescencijos fotoną, arba vidine konversija, kurios metu sužadinimo energija virsta šiluma, kuri taip yra atiduodama tirpiklio molekulėms [16].

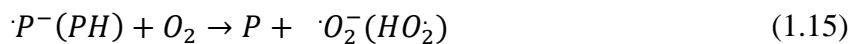
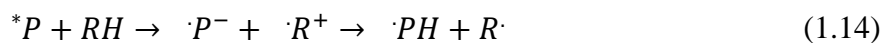
### 1.6 Fotosensibilizacijos reakcijos

Kai sužadintas fotosensibilizatorius sąveikauja su aplinkinėmis molekulėmis yra galimos dviejų tipų reakcijos: I tipo reakcijų metu susidaro laisvi fotosensibilizatorių radikalai, o II tipo reakcijos – vyksmai, kurių metu sužadintos fotosensibilizatoriaus molekulės sąveikauja su deguonimi (1.3 pav.).



1.3 pav. Apibendrinta fotosensibilizacijos schema [19]

I tipo fotosensibilizuotos reakcijos atveju sužadinta sensibilizatoriaus molekulė, kuri yra tripletinėje būsenoje, gali atplėšti ar atiduoti elektroną (arba vandenilį) aplinkoje esančioms molekulėms. I tipo reakcijos vyksta, kai yra mažas atstumas tarp sensibilizatoriaus ir substrato, taip pat kai terpėje yra daug substrato ir mažai deguonies:



čia  $P$  ir  ${}^*P$  – pagrindinė ir sužadinta fotosensibilizatoriaus molekulių būsenos;  $\cdot P^-$  ir  $\cdot PH$  – laisvieji fotosensibilizatoriaus radikalai, susidarantys redukuojantis fotosensibilizatoriui;  $RH$  – oksiduojama substrato molekulė;  $\cdot R^+$ ,  $R\cdot$  ir  $RO_2$  – laisvieji radikalai, susidarantys oksiduojantis aplinkinėms molekulėms.

I tipo reakcijų metu susidarę radikalai yra chemiškai labai aktyvūs. Dažnai substrato radikalai reaguoja su deguonimi, taip sudarydami įvairių tipų oksiduotus produktus. Dažnai tai gali būti peroksidai, kurie toliau gali reaguoti su aplinkinėmis molekulėmis, taip inicijuodami grandininius laisvųjų radikalų tipo savioksidacijos procesus. I tipo reakcijose formuojasi superoksianijono radikalas, rūgštinėse terpėse sudarantis peroksidradikalą. Tokie radikalai efektyviai oksiduoja biosubstratus ir dismutacijos reakcijoje sudaro vandenilio peroksidą. Reakcijos metu gali būti generuojamos sužadintos singuletinės būsenos deguonies molekulės. Reaguojant

superoksianijono ir peroksi- radikalams su vandenilio peroksidu susidaro dar stipresnis oksidatorius – hidroksilo radikalas [16].

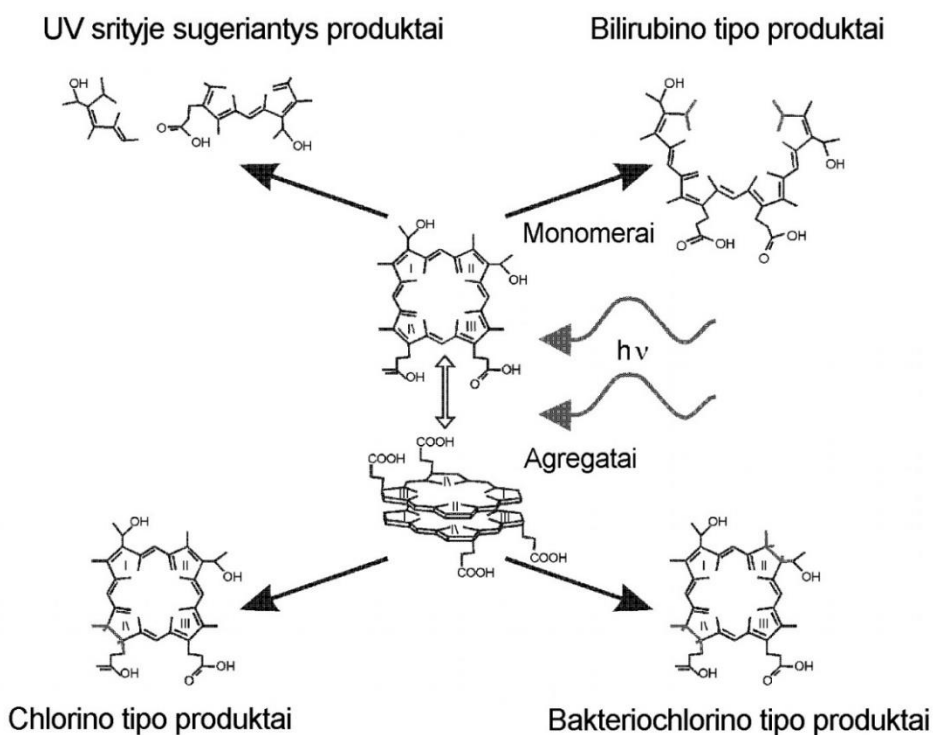
II tipo fotosensibilizuotos reakcijos metu sužadintas tripletinės būsenos fotosensibilizatorius perteklinę energiją perduoda deguonies molekulei, kuri yra taip pat tripletinėje būsenoje, taip sužadindamas deguonies molekulę į singuletinę būseną:



Kadangi abi reakcijoje dalyvaujančios medžiagos yra tripletinėje būsenoje, energijos pernaša tarp jų yra nedraudžiama ir vyksta efektyviai. Deguonis, esantis tripletinėje būsenoje, dėl sukinio draudimo negali efektyviai reaguoti su aplinkinėmis molekulėmis, nes paprastai organinių molekulių pagrindinė būseną yra singuletinė. Bet kai sužadintas deguonis pereina į singuletinę būseną, sukinio draudimas nebegalioja. Singuletinis deguonis taip pat yra ir labiau elektrofiliškas, todėl aktyviau reaguoja su biomolekulėmis, kurios yra linkę atiduoti elektronus [11].

### 1.7 Sensibilizatorių fotostabilumas ir fototransformacijos

Fotosensibilizatoriui yrant švitinimo metu mažėja sugeriamos šviesos kiekis, nes šviesa gali sukelti sensibilizatorių destrukciją. Sensibilizatorių fotostabilumo tyrimai parodė, kad švitinimo metu blunka sugerties ir fluorescencijos juostos, bet taip pat dar formuojasi naujos tiek sugerties, tiek fluorescencijos juostos. Fotocheminių reakcijų metu porfirino tipo fotosensibilizatorius gali virsti į kelių rūšių fotoproduktus: UV srityje sugeriančius produktus, bilirubino tipo produktus, chlorino tipo produktus ir bakteriochlorino tipo produktus (1.4 pav).



1.4 pav. Porfirino tipo pigmentų švitinimo metu susidarantys fotoproduktai [16]

Kai kuriuose tyrimuose švitinimo metu buvo matomas padidėjimas 240-340 nm režiuose, kas rodo, kad porfirino makrociklas švitinimo metu gali suskilti į mažus darinius, kurie sugeria šviesą UV spektro dalyje. Šie dariniai gali būti atskiri porfirino molekulę sudarantys pirolo žiedai ar jų junginiai.

Švitinant porfirino tipo pigmentus, kai aplinkoje yra specifiniai oksidatoriai ar reduktoriai, yra galimybė susidaryti chlorino ir bakteriochlorino kilmės pigmentams, dėl kurių yra pastebimas sugerties padidėjimas 640-660 nm bangos ilgio ribose. Yra manoma, kad švitinimo metu yra redukuojamos dvigubos porfirino jungtys, bet yra pastebimi ir panašūs pokyčiai protoporfirino tirpaluose. Šie pokyčiai buvo aiškinami per deguonies sąveiką su porfirino makrociklo šoninėmis grupėmis [17].

Yra galimas ir dar vienas fotoproduktų tipas, kuris yra panašus į bilirubino tipo pigmentus. Tokio tipo pigmentai susidaro, kai vienoje vietoje trūksta porfirino ciklas, taip susiformavus atvirai keturių pirolo žiedų struktūrai. Fotoproduktai, kurie yra panašūs į bilirubino pigmentus, yra labai nestabilūs, egzistuoja trumpą laiko tarpą ir galiausiai suyra į UV spektro srityje sugeriančias atskiras pirolo žiedų kombinacijas [16].

Atlikti tyrimai parodė, kad švitinant monomerines porfirinų formas dažniausiai susidaro fotoproduktai, kurie sugeria šviesą UV srityje, o agregatinės formos yra linkę generuoti chlorino ar bakteriochlorino tipo fotoproduktus [17].

## **1.8 Fotosensibilizacijos poveikis biomolekulėms**

Lipidai yra vandenyje netirpių biomolekulių klasė, kuriai yra priskiriami riebaliniai vaškai, fosfolipidai ir steroidai. Fosfolipidai fotobiologijoje atlieka svarbų vaidmenį, kadangi jie (kaip ir baltymai) yra pagrindiniai ląstelių membranų struktūriniai komponentai. Fosfolipidai yra sudaryti iš fosforo rūgšties likučio ir riebalų rūgščių. Riebalų rūgštys gali būti sočiosios arba nesočiosios (turinčios dvigubą C=C jungtį) [16].

Nesočiosios rūgštys gali būti fotooksiduotos ir I tipo, ir II tipo fotosensibilizuotos reakcijos metu. Nors pirminiai produktai abiejų reakcijų yra aliliniai hidroperoksidai, tačiau pati reakcijų kinetika ir produktų izomerai abiejų tipo reakcijose yra skirtingi. I tipo reakcijų metu susidaro aliliniai laisvieji radikalai, kurie toliau reaguoja sudarydami įvairius hidroperoksirus, kaip ir kitus produktus (alkoholius, epoksidus ir ketonus) [17].

## **1.9 Ypač tyras alyvuogių aliejus**

Išskirtinės alyvuogių aliejaus charakteristikos: kvapas, skonis, maistingosios savybės, stabilumas, jį išskiria iš kitų valgomųjų augalinių aliejų. Alyvuogių aliejaus vartojimas mažina tikimybę susirgti išeminėmis širdies ligomis, diabetu, kai kuriomis vėžinėmis ligomis ir kitomis chroninėmis ligomis [18].

Chlorofilai yra pigmentai, nuo kurių priklauso žalia alyvuogės spalva. Natūraliai atsirandančios cheminės ir fizikinės reakcijos alyvuogėje lemia jos spalvos kitimą nokstant ir svarbios iš alyvuogių gaminamo aliejaus spalvai. Alyvuogei nokstant jos spalva kinta nuo šviesiai žalios iki juodos. Šie spalvos pokyčiai priklauso nuo fotosintetinio aktyvumo vaisiui nokstant, prie to dar prisideda antocianinų padaugėjimas, dėl kurio atsiranda raudonų dėmelių. Alyvuogei nokstant vyksta didelis chlorofilų pigmentų mažėjimas [19].

Chlorofilo-a alyvuogėje yra daugiau negu chlorofilo-b santykiu 3/1. Taip pat yra randama chlorofilido ir feoforbido pėdsakų. Be to, buvo pastebėta, kad chlorofilų koncentracija priklauso nuo alyvmedžio rūšies ir laiko, kada jos buvo nuskintos. Alyvuogės, kurios buvo nuskintos iki pilno prinokimo, turėjo didesnę chlorofilų koncentraciją [12].

Alyvuogių aliejus kitaip negu kiti augaliniai aliejai yra gaminamas tik mechaniniu ar fizikiniu būdu užtikrinant natūralias vaisiaus charakteristikas. Gaminant alyvuogių aliejų yra prarandama apie 80% chlorofilų lyginant su vaisiumi. Tai rodo, kad žalio pigmento aliejuje yra žymiai mažiau negu alyvuogėje. Malimo procese iš vaisiuje randamų chlorofilo-a ir chlorofilo-b negrįžtamai susidaro kiti pigmentai — feofitinas, vėliau pyrofeofitinas. Šitie pokyčiai veikia ir aliejaus spalvą, kuri keičiasi nuo šviesiai žalios ir rudos iki geltonos. Aliejaus spalvai taip pat gali daryti įtaką tai, kad gamybai buvo naudotos nevisiškai prinokusios alyvuogės. Spalvos pokyčiai alyvuogėje rodo nykstantį chlorofilų kiekį, kurį keičia jų produktai, tamsiai žali feofitinas-a ir b [20].

Tyrimai parodė, kad feofitinas-a buvo pagrindinis pigmentas (daugiau nei 75%), kai chlorofilo-a kiekis kartais buvo sunkiai išmatuojamas. Chlorofilo-b buvo tarp 0 ir 5,19 mg/kg, o feofitino-b nuo 0,005 iki 9,72 mg/kg. Taip pat buvo pastebėta, kad prinokimo lygis irgi turėjo įtaką pigmentų kiekiui. Aliejus, gamintas iš juodų alyvuogių, turėjo apie 30% mažiau žalių pigmentų nei iš žaliųjų alyvuogių, o gaminamas iš raudonųjų turėjo 20-25% mažiau. Chlorofilų kiekis pastoje, išspaudose ir aliejuje atitinkamai mažėja (1.1 lent.) [21]. YTAA esantys pigmentai su savo charakteringų juostų vietomis yra nurodyti 1.2 lentelėje.

**1.1 lentelė.** Pigmentų, esančių graikiškame ypač tyrame aliejuje, kiekis [19]

Technologija	Viso chlorofilų	Chlorofilas-b	Chlorofilas-a	Feofitinas-b	Feofitinas-a
<b>Žalios alyvuogės</b>					
Dviejų fazių	-	0,9	-	0,4	21,6
Trijų fazių	-	0,4	-	0,01	18,2
<b>Juodos alyvuogės</b>					
Dviejų fazių	-	0,4	-	-	14,5
Trijų fazių	-	0,2	-	-	13,8

Tarptautinė alyvuogių aliejaus taryba (IOOC) yra įvardinusi kriterijus, kuriais remiantis alyvuogių aliejai yra skirstomi į skirtingas rūšis: tyras (ang. virgin), rafinuotas (ang. refined) ir grynas (ang. pure). Geriausią kokybę turintis alyvuogių aliejus yra žinomas kaip ypač tyras (ang. extra virgin), jis yra gaunamas po pirmo šalto alyvuogių spaudimo. Rafinuotas alyvuogių aliejus yra gaunamas naudojant rafinavimo metodus, po kurių nesikeičia pradinė gliceridinė struktūra, o grynas alyvuogių aliejus yra tiesiog gryno ir rafinuoto alyvuogių aliejų mišinys [2].

Pirminė priežastis, kodėl alyvuogių aliejus praranda savo kokybę, yra oksidacija. Alyvuogių aliejų oksidacija gali paveikti keliais skirtingais būdais, tokiais kaip: fotooksidacija (esant šviesos poveikiui) arba autooksidacija (tamsoje) [5]. Tačiau alyvuogių aliejus yra laikomas ganėtinai atsparus oksidacijai dėl jame natūraliai esančių antioksidantų, kaip karotinoidų ar tokoferolių [4]. Fotooksidacijos metu keičiasi aliejaus spalva ir skonis, gali atsirasti nemalonas kvapas [20].

YTAA yra didelis kiekis nesočiųjų riebalinių rūgščių ir fenolinių junginių, kurie vyrauja nuo paprastų iki sudėtingų struktūrų. Šie junginiai gali reaguoti su laisvaisiais radikalais ar singuletiniais deguonimi taip paveikdami YTAA oksidacinį stabilumą [22].

1.2 lentelė. Alyvuogių aliejuje esančių komponentų spektrinės savybės [23]

	Tirpiklis	$\lambda_{\text{abs}}$ , nm	$\epsilon$	Tirpiklis	$\lambda_{\text{ex}}$ , nm	$\lambda_{\text{em}}$ , nm
<b>Vitaminas E</b>						
$\alpha$ -tokoferolis	etanolis	292	3265	n-heksanas	295	320
$\beta$ -tokoferolis	etanolis	296	3725	n-heksanas	297	322
$\delta$ -tokoferolis	etanolis	298	3515	n-heksanas	297	322
$\gamma$ -tokoferolis	etanolis	298	3809	n-heksanas	297	322
$\alpha$ -tokotrienolis	etanolis	292	3652	n-heksanas	290	323
$\beta$ -tokotrienolis	etanolis	292	3540	n-heksanas	290	323
$\delta$ -tokotrienolis	etanolis	297	3403	n-heksanas	292	324
$\gamma$ -tokotrienolis	etanolis	297	3737	n-heksanas	290	324
<b>Karotinoidai</b>						
$\beta$ -karotinas	n-heksanas	450	3500			
Luteinas	n-heksanas	445	3550			
<b>Chlorofilai</b>						
Chlorofilas-a	acetonas	430	94700	eteris	436	668
				acetonas	405	669
				9:1 acetonas/vanduo	430	669
Chlorofilas-b	acetonas	455	161000	eteris	436	648
				acetonas	405	652
				9:1 acetonas/vanduo	458	653
Feofitinas-a	acetonas	409	101800	eteris	436	673
				9:1 acetonas/vanduo	406	671
Feofitinas-b	acetonas	434	145000	eteris	436	661
				9:1 acetonas/vanduo	435	658
Feoforbidas-a	acetonas	409	119200	-	-	-
				667	55200	-
<b>Fenoliniai junginiai</b>						
Oleuropeinas	etanolis/n-heksanas	282	-	etanolis/n-heksanas	270	310
Vanilino rūgštis				Metanolis	270	349
Siridžino rūgštis					270	361
Galio rūgštis					270	382
p-kumarino rūgštis						416
o-kumarino rūgštis					270	426
Cinamino rūgštis					270	420
Tirosolis					270	420
Kofeino rūgštis					270	457

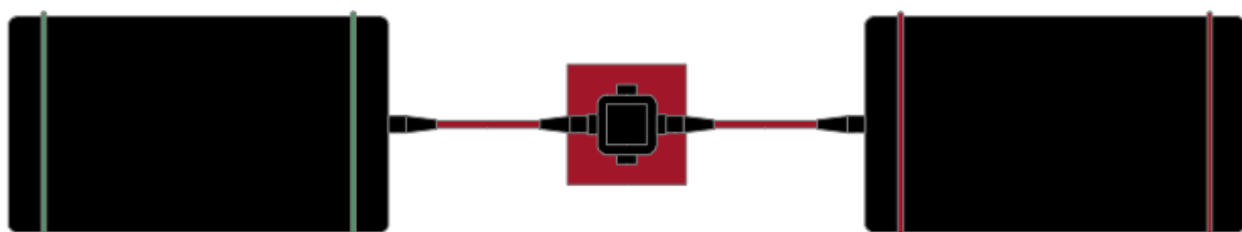
$\lambda_{\text{abs}}$  – sugerties juostos maksimumas,  $\epsilon$  – ekstinkcijos koef.,  $\lambda_{\text{ex}}$  – fluorescencijos žadinimo juostos maksimumas,  $\lambda_{\text{em}}$  – fluorescencijos juostos maksimumas.

## 2. Eksperimentinė dalis

### 2.1. Prietaisai, naudoti šiame darbe

Spektriniai matavimai buvo atliekami naudojant Avantes-2048 šviesolaidinį spektrometrą (2.1 pav) ir *AvaSoft* programą. Programoje yra keturi skirtingi režimai, naudojami mėginiams tirti: paprasto vaizdavimo, sugerties, pralaidumo ir apšvitos.

Sugerties režime yra matuojamas šviesos šaltinio ir bandinio spektro skirtumas. Tai yra atliekama pirmiausiai matuojant „tamsinį“ spektrą – spektras matuojamas nešviečiant lempai. Toliau yra matuojamas atraminis „šviesinis“ spektras. Jis yra matuojamas be bandinio arba su kiuvete, kurioje yra medžiaga, kurios nenorime matyti bandinio sugerties spektre. Po „nušviesinimo“ įdedamas bandinys, matuojamas jo spektras, o programoje yra atvaizduojamas šitų dviejų spektrų skirtumas.



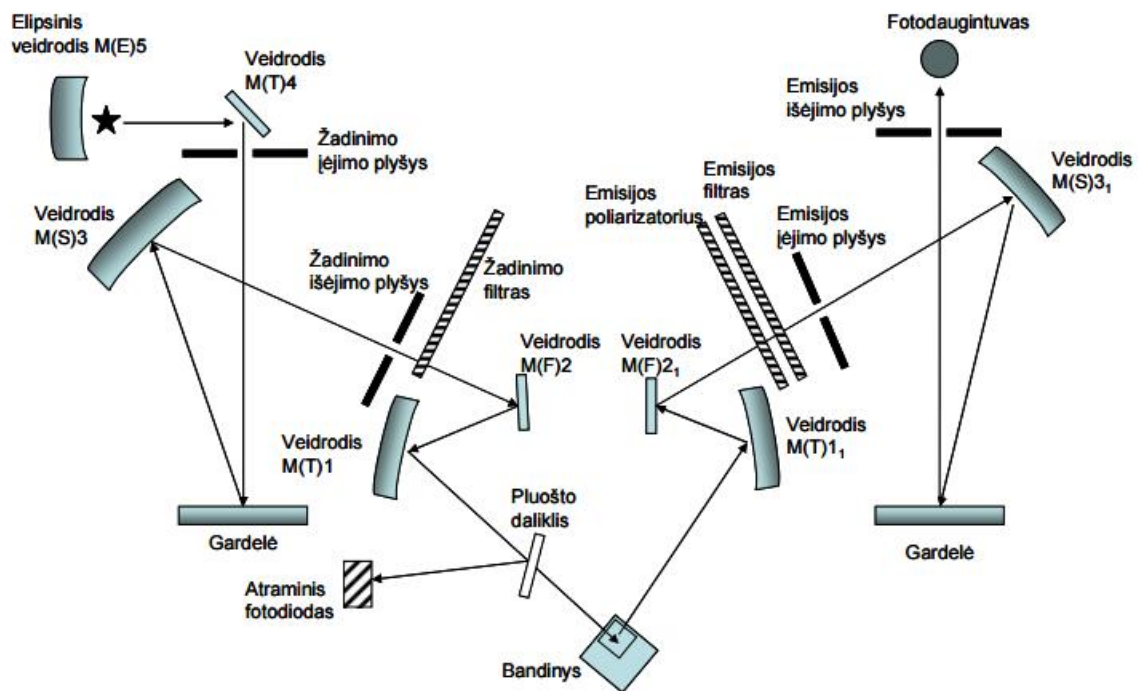
2.1 pav. Avantes-2048 šviesolaidinio spektrometro schema

Emisijos ir žadinimo spektrų matavimai buvo atliekami Perkin Elmer LS55 fluorimetru (2.2 pav.) ir jo valdymo programa *FL WinLab*.

Matuojant emisijos spektrą į fluorimetro kamerą yra įdedamas bandinys, toliau yra parenkamos emisijos spektro ribos (200 nm – 900 nm), pasirenkamas žadinimo bangos ilgis (200 nm – 800 nm), nustatomi sužadavimo (2,5 nm – 15 nm) ir emisijos (2,5 nm – 20 nm) monochromatorių plyšių pločiai, be to, galima keisti skenavimo greitį, nuo kurio priklauso išmatuoto spektro signalo ir triukšmo santykis.

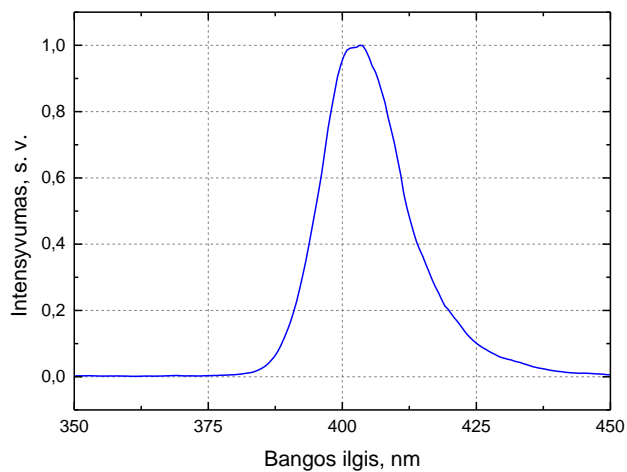
Žadinimo spektro matavimas yra panašus į emisijos spektro matavimą. Skiriasi tuo, kad pasirinkti režiai yra fluorescencijos žadinimo spektro ribos, o vietoje žadinimo bangos ilgio pasirenkamas fluorescencijos bangos ilgis, kuriame bus matuojamas fluorescencijos intensyvumas.





2.2 pav. Perkin Elmer LS55 fluorimetro veikimo schema

Bandinių švitinimo eksperimentams buvo pasirinktas mėlyną šviesą skleidžiantis diodas, kurio spektrinis intensyvumas buvo didžiausias ties 404 nm (2.3 pav.), o galios tankis buvo apie 40 mW/cm<sup>2</sup>.

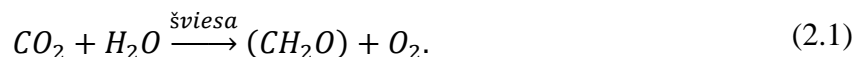


2.3 pav. Mėlyną šviesą skleidžiančio diodo spektras

## 2.2. Tiriamos medžiagos

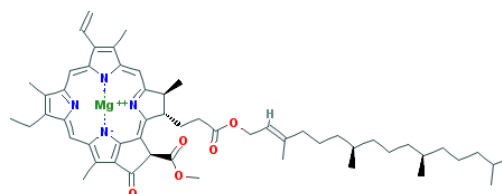
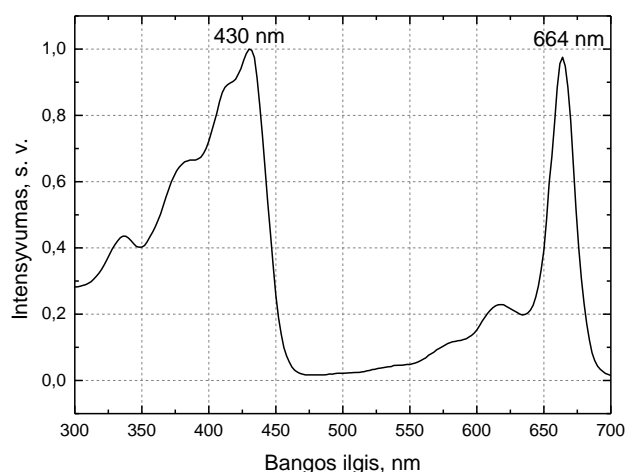
### 2.2.1 Chlorofilai

Chlorofilai yra gamtiniai fotosensibilizatoriai, kurie perduoda energiją kitoms augalo medžiagoms, o šios panaudoja tą energiją tolimesniems procesams. Fotosintezės metu chlorofilų sugertų šviesos fotonų energija yra naudojama anglies dvideginį ir vandenį versti į angliavandenius ir deguonį:



Chlorofilai geriausiai sugeria mėlynos (400 – 450 nm) ir geltonos (650 – 680 nm) regimosios spektro dalies ruožus, tačiau blogai sugeria žalią šviesą (apie 530 nm), dėl to augalai ir yra žalios spalvos [5, 12].

Chlorofilai – chlorino pigmentai yra struktūriškai panašūs į kitus porfirinų pigmentus, pvz., hemą. Chlorofilą iš esmės sudaro dvi dalys: porfirinų žiedas, kurio centre yra magnio atomas, ir fitolio grandinė. 1928 m. S. Willstater įrodė, kad chlorofilas yra dviejų medžiagų mišinys – chlorofilo-*a* ir chlorofilo-*b* (2.4 pav.). Natūralų chlorofilą sudaro abu chlorofilai santykiu 3/1 [13].

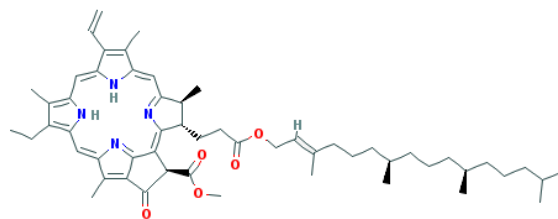
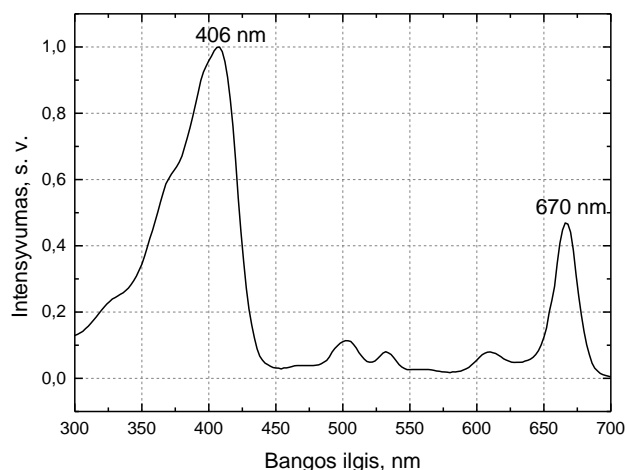


2.4 pav. Chlorofilo-*a* sugerties spektras [24]

2.5 pav. Chlorofilo-*a* struktūra [24]

### 2.2.2 Feofitinas

Feofitino struktūra yra labai panaši į chlorofilo molekulės. Ji yra tiesiog be centrinio magnio atomo, kurį pakeičia du vandenilio atomai (2.5 pav.). Magnio atomo dingimas iš tetrapirolo žiedo yra cheminė reakcija, kuri vyksta, kai chlorofilas-*a* yra paveiktas rūgštinės aplinkos [25].

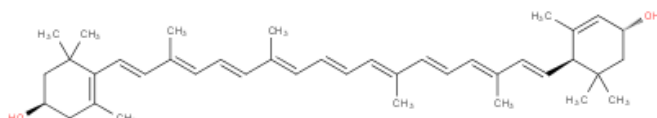
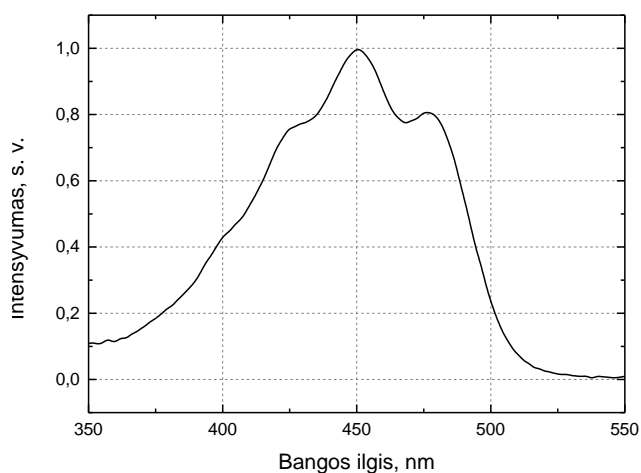


**2.6 pav.** Feofitino-a sugerties spektras [26]

**2.7 pav.** Feofitino-a struktūra [26]

### 2.2.3 Karotinai

Karotinoidai gali būti suskirstyti į dvi grupes – karotinus ir ksantofilus. Pagrindiniai du karotinoidai randami YTAA yra  $\beta$ -karotinas ir luteinas. Dėl rūgštingos aplinkos karotinoidai gali izomerizuotis, dėl to YTAA galima rasti luteoksantino, auroksantino, neochromo ir kitų karotinoidų [27].

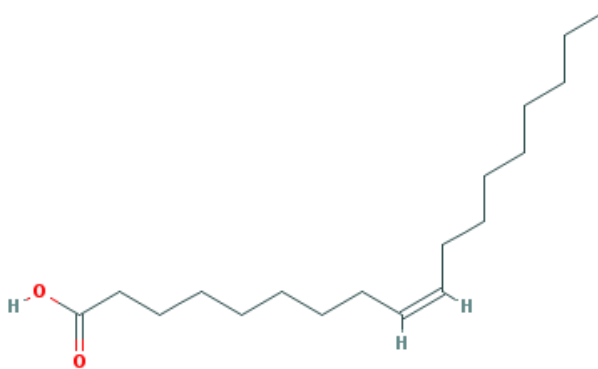


**2.8 pav.** Luteino sugerties spektras [28]

**2.9 pav.** Luteino struktūra [28]

### 2.2.4 Nesočiosios riebalinės rūgštys

Nesočiosios riebalinės rūgštys turi bent vieną dvigubą ryšį riebalų rūgčių struktūroje. Jos gali būti dviejų rūšių: mono-nesočiosios riebalų rūgštys (turi vieną  $\pi$  ryšį) arba poli-nesočiosios riebalų rūgštys (turi kelis  $\pi$  ryšius). Kuo riebalinė rūgštis turi daugiau dvigubų ryšių, tuo ji labiau yra linkusi peroksidacijai. Antioksidantai gali apsaugoti nesočiąsias riebalines rūgštis nuo oksidacijos.

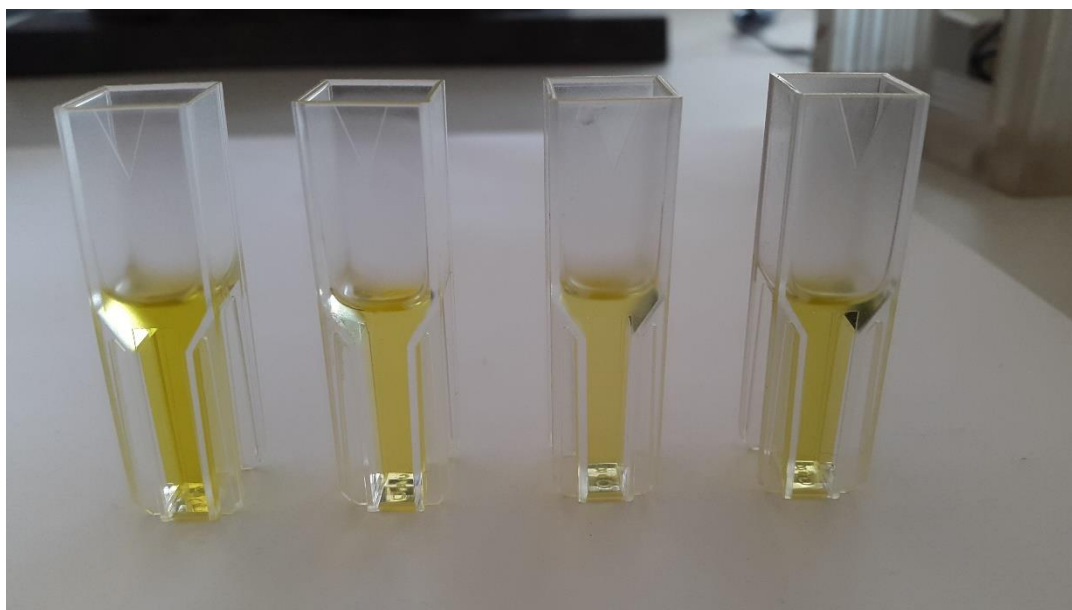


*2.10 pav. Oleino rūgštis struktūra [29]*

## 2.3. Darbo metodika

### 2.3.1. Bandiniai

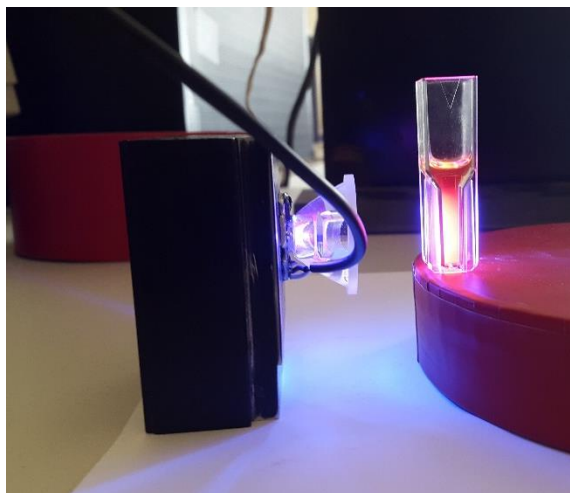
Tyrimams buvo pasirinkti keturi komerciškai prieinami YTAA: du iš Ispanijos, po vieną iš Italijos ir Graikijos. Tiriant aliejų spektrines savybes jie buvo laikomi 45 mm × 10 mm × 10 mm (2.11 pav.) kiuvetėse po 1 ml aliejaus. Tarp bandymų YTAA buvo laikomas uždareme inde, tamsoje.



*2.11 pav. YTAA aliejaus bandiniai kiuvetėse.*

### 2.3.2 Blukimo matavimai

Matuojant blukimo efektą YTAA buvo šviečiami su mėlyną šviesą skleidžiančiu diodu (2.12 pav). Bandiniai buvo švitinami po dešimt minučių esant apie 40 mW/cm<sup>2</sup> šviesos intensyvumui su kelių minučių pertraukomis tarp švitinimų.



*2.12 pav. Diodu švitinamas aliejaus bandinys*

### **2.3.3 Fluorescencija**

Keičiant žadinimo bangos ilgį, pasirenkant jį iš sugerties spektrų, buvo matuojami YTAA bandinio fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai pasinaudojant Perkin Elmer LS55 fluorimetru.

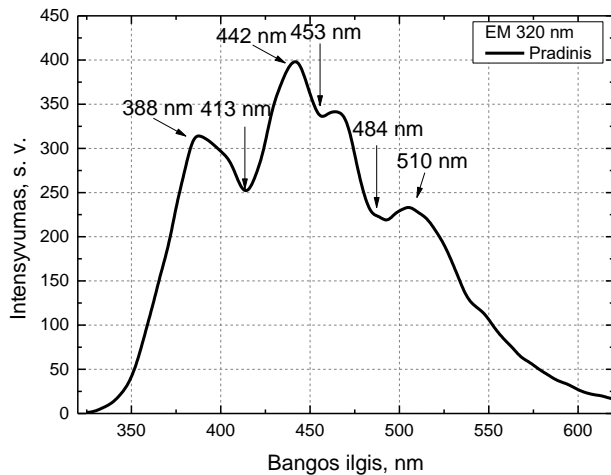
### **2.3.4 Skirtingos švitinimo sąlygos**

Norint išsiaiškinti deguonies poveikį fotovirsmams buvo švitinami du YTAA bandiniai – vienas atviroje vonelėje su dideliu paviršiaus plotu, kitas uždaroje kiuvetėje su žymiai mažesniu paviršiaus plotu, galinčiu sąveikauti su deguonimi. Abiem atvejais buvo bandoma išlaikyti kuo panašesnes švitinimo sąlygas, sistema buvo surinkta taip, kad šviesos intensyvumas būtų vienodas (apie  $40 \text{ mW/cm}^2$ ) ir būtų švitinamas toks pat bandinio plotas (apie  $1 \text{ cm}^2$ ).

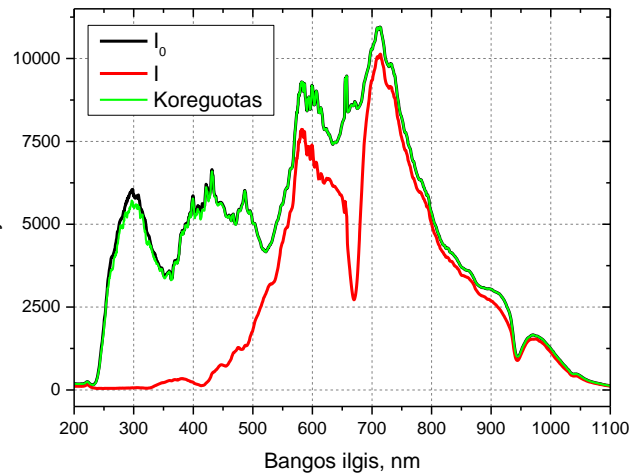
### **2.3.5 Fluorescencijos spektrų koregavimas**

Fluorescencijos spektrai, kurie buvo žadinami 320-350 nm (2.13 pav.), persidengia su feofitino-a ir  $\beta$ -karotino sugerties spektrais, dėl to gautos juostos yra filtruojamos paties YTAA ir yra gaunamos „išgraužos“, kurios atitinka YTAA sugerties spektro juostas (413 nm, 453 nm, 484nm). Kad būtų atkurtas tikras fluorescencijos spektras, reikėjo laikyti, kad YTAA veikia kaip vidinis filtras ir keičia fluorescencijos spektro formą.

Kai sužadinta molekulė išspinduliuoja fluorescencijos fotoną, jis turi praeiti dalį kiuvetėje esančio tirpalo, kol galiausiai pasiekia fotodaugintuvą. Jei fluorescencijos spektras persikloja su kiuvetėje esančio tirpalo sugerties spektru, galima laikyti, kad tirpalas veikia kaip vidinis filtras fluorescencijos spektrui. Tuomet fluorescencijos intensyvumas  $I_0$ , praėjęs dalį tirpalo ir prieš pasiekiant detektorius sumažės.



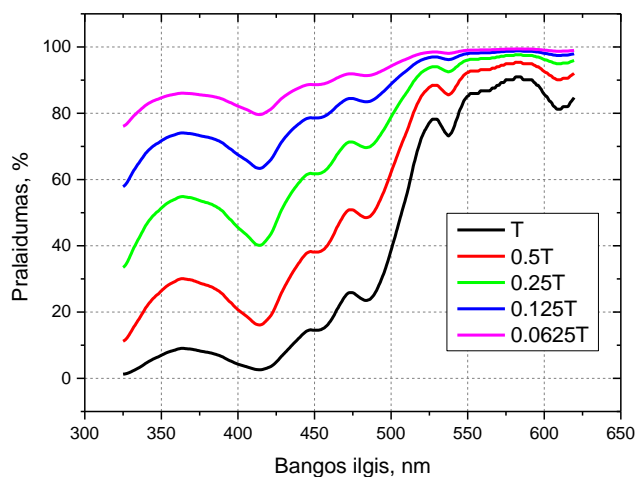
**2.13 pav.** YTAA fluorescencijos spektrai, žadinti ties 320 nm



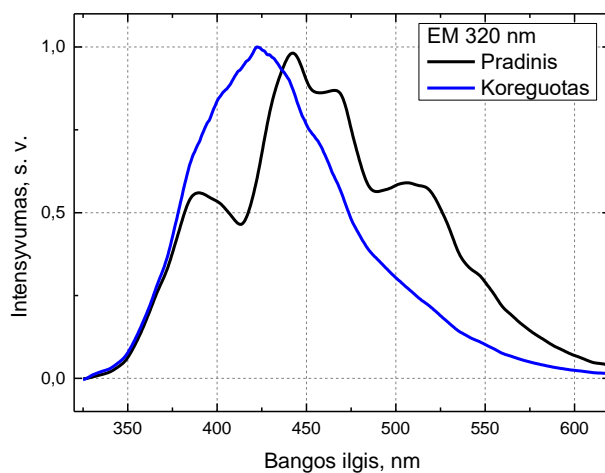
**2.14 pav.** Koregavimo proceso matematinio modelio tikrinimas

Kadangi matuojant Avantes-2048 šviesolaidiniu spektrometru nebuvo gauta YTAA pralaidumo spektrų, tai pasinaudojant Lamberto–Bugerio–Bero dėsniumi YTAA sugerties spektras buvo perskaičiuojamas į pralaidumo spektrą (1.10 formulė). Tikrinant, ar matematinis modelis yra teisingas, buvo bandoma atkurti pradinį lempos spektrą (2.14 pav.). Praėjusios pro kiuvetę šviesos intensyvumas  $I_0$  buvo padalinamas iš pralaidumo spektro ir taip gaunamas koreguotas spektras. Lyginant gautą koreguotą spektrą su pradiniu Avantes-2048 spektrometro lempos spektru galima matyti neatitikimų UV srityje, tačiau tai yra dėl to, kad 220-350 nm srityje YTAA sugerties spektras yra įsisotinęs.

Buvo bandoma surasti atitinkamą korekcinę kreivę fluorescencijos spektrui (2.15 pav), bet kadangi Perkin Elmer LS55 fluorimetre šaltinio šviesa, kuri apšviečia bandinį, ir detektorius tarpusavyje stovi  $90^\circ$  kampu, galima teigti, kad molekulės išfluorescuotas fotonas turi praeiti pusę kiuvetės, kol galiausiai pasiekia fotodaugintuvą. Iš to seka, kad tinkama korekcinė kreivė turėtų atitikti pralaidumą per pusę optinio kelio, kurį fotonas praeina kiuvetėje. Gautas fluorescencijos spektras atitinka kitų autorių gautais YTAA spektrus, kurie buvo žadinti panašiam ruože [23].



*2.15 pav. YTAA pralaidumo spektrai ties skirtingais optiniais keliais*



*2.16 pav. Koreguotas YTAA fluorescencijos spektras*

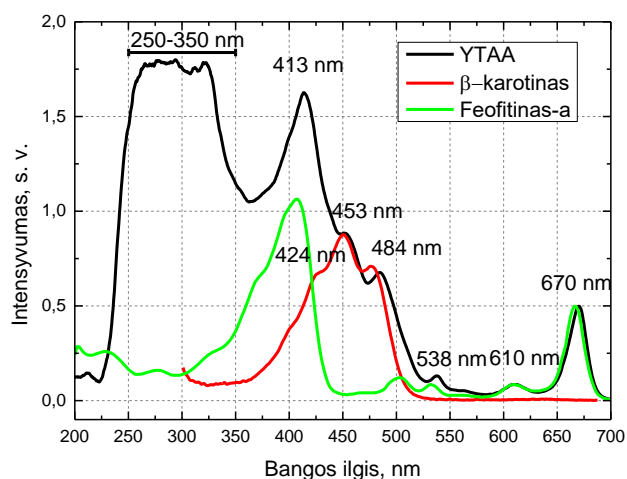
### 2.3.6 Duomenų analizė

Spektrinė analizė ir skaičiavimai buvo atliekami su OriginPro 9.0 programine įranga. Lyginant spektrus su atskirų medžiagų sugerties, fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrais buvo dirbama su PhotochemCAD 2.1 programa.

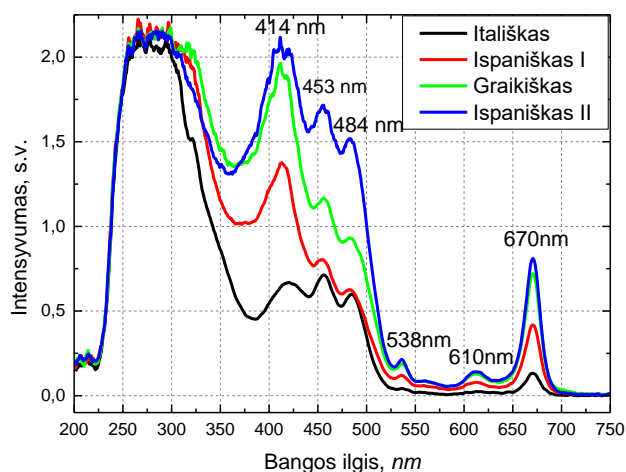
### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1 YTAA sudėtis ir fotovirsmas

Iš YTAA sugerties spektro kompozicijos galima spręsti, kad ji susidaro iš trijų charakteringų juostų:  $\beta$ -karotino (453 nm, 484 nm), feofitino-a (413 nm, 538 nm, 610 nm, 670 nm) ir 250-350 nm juostos, kuri dėl sugerties įsisotinimo nėra gerai išreikšta. Šiai juostai galima priskirti įvairius fenolinius ir vitamino E junginius (3.1 pav., 2.2 lentelė). Buvo matuoti įvairių YTAA (du ispaniški, itališkas ir graikiškas) sugerties spektrai (3.2 pav.). Aliejų spektrai iš skirtingų regionų skyrėsi feofitino-a ir karotinoidų spektriniais intensyvumais. Šių pigmentų kompozicija priklauso nuo vaisių prinokimo lygio, klimato sąlygų, auginimo regiono, apdorojimo technikų, laikymo sąlygų [30].



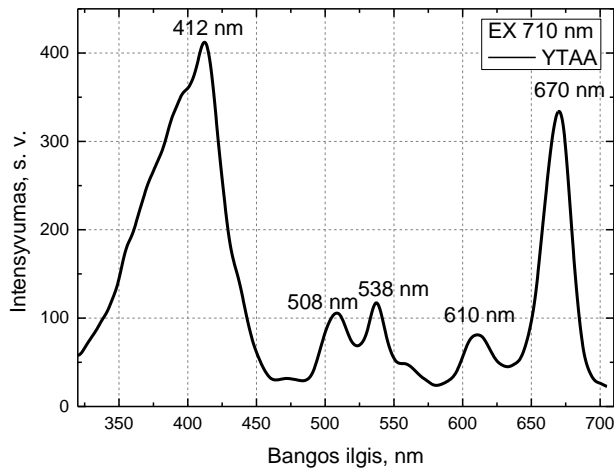
3.1 pav. YTAA sugerties spektras ir jo sudedamosios dalys



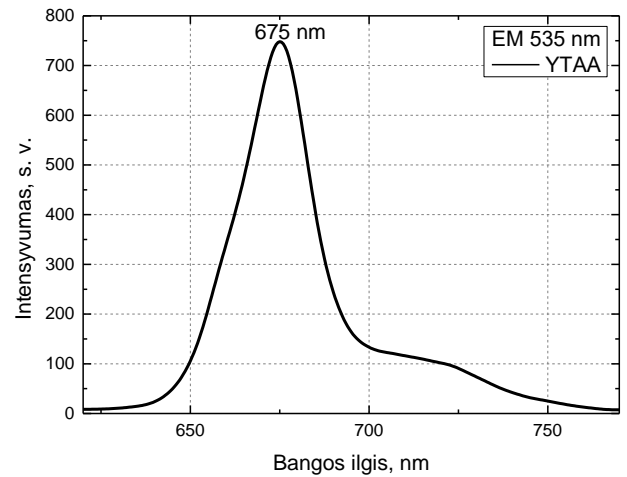
3.2 pav. Skirtingų YTAA sugerties spektrai

Alyvuogių aliejuje yra aptinkami ir feofitinas-a, ir feofitinas-b [23], tačiau kadangi YTAA feofitino-a dažniausiai yra virš 50 kartų daugiau nei feofitino-b (2.1 lentelė), jo charakteringų juostų negalime išskirti bendrame YTAA sugerties spektre (3.1 pav.). Fluorescencijos matavimai yra daug jautresni ir detalesni nei sugerties matavimai, dėl to matuojant YTAA fl. spektrą ir žadinant jį ties vienu iš feofitino-a sugerties juostos maksimumų (535 nm) buvo gautas charakteringas feofitino-a fluorescencijos spektras (3.4 pav.) [23]. Fluorescencijos žadinimo spektras (3.3 pav) buvo matuojamas ties 710 nm, kadangi žadinant į fluorescencijos spektro maksimumą (675 nm) fotodetektorius įsisotindavo. Išmatuoto spektro maksimumai atitinka sugerties spektre matomas charakteringas juostas, todėl galima teigti, kad tos juostos tikrai priklauso feofitinui-a. Žadinant YTAA į feofitino-b Soret juostos maksimumą (435 nm) [23], buvo gautas fluorescencijos spektras, kuris susidaro iš feofitino-a ir feofitino-b fluorescencijos spektrų (3.5 pav.).

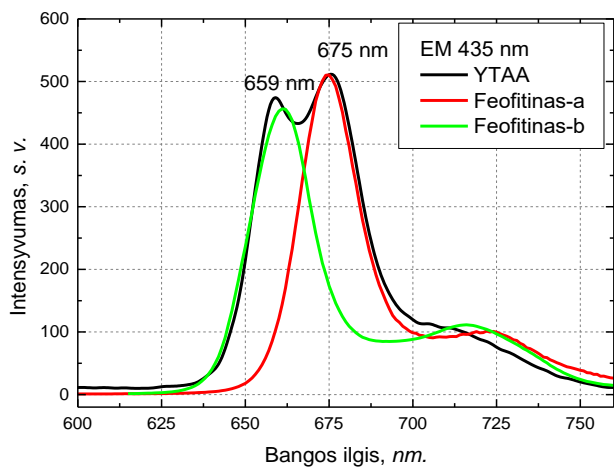




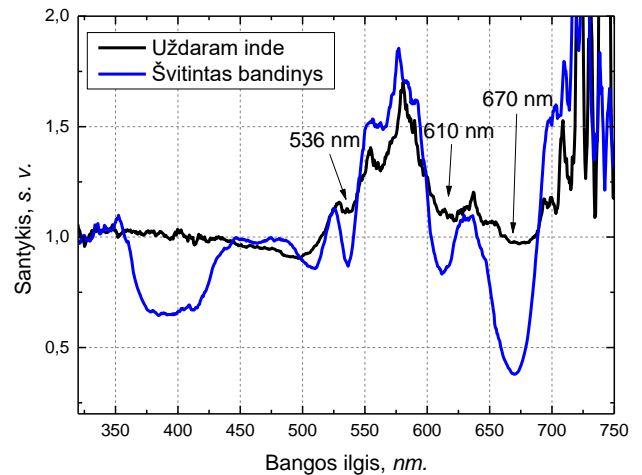
**3.3 pav.** YTAA fluorescencijos žadinimo spektras, matuotas ties 710 nm



**3.4 pav.** YTAA fluorescencijos spektras, žadintas ties 535 nm



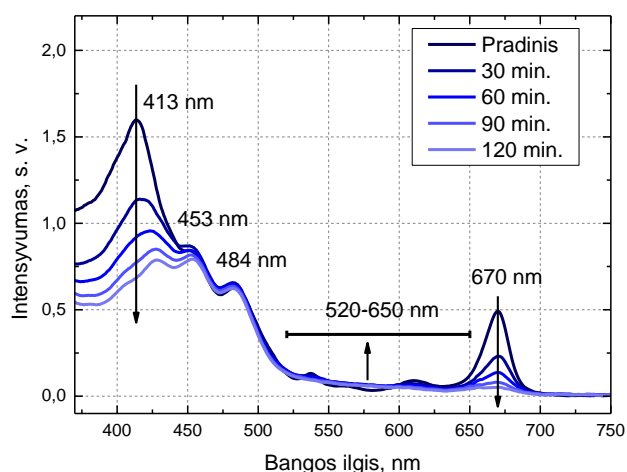
**3.5 pav.** YTAA fluorescencijos spektrai, žadinto ties 435 nm sudėtis



**3.6 pav.** Susidariusių fotoproduktų santykinių spektrų palyginimas

Švitinant YTAA mėlyną šviesą skleidžiančiu diodu (2.3 pav.) galima pastebėti, kad 400-700 nm spektro dalyje sugerties intensyvumas mažėja dviejuose vietose – 414 nm ir 670 nm (3.7 pav.). Abu šie maksimumai priklauso feofitinui-a. Per visą švitinimo laiką (2 val.) nubluko beveik visas feofitinas-a. Taip pat 520-650 nm spektro dalyje galima išskirti intensyvumo augimą t. y. susidariusį fotoproduktą.

Stebint YTAA senėjimo procesus, sugerties spektrai buvo matuojami praėjus 2, 4, 7 ir 9 savaitėms po aliejaus išgijimo. 3.8 pav. galima matyti, kad priešingai nei švitinimo eksperimente be chlorofilų juostos intensyvumo mažėjimo yra pastebimas ir karotinoidų juostos intensyvumo mažėjimas. Taip pat galima išskirti, kad abiejuose eksperimentuose buvo pastebimas fotoprodukto susidarymas.

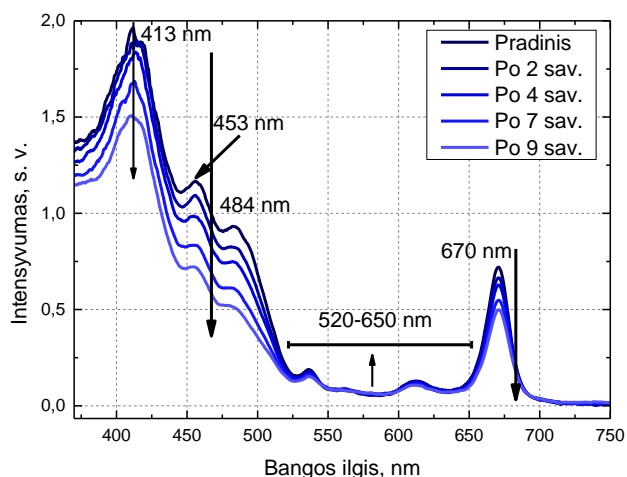


**3.7 pav.** YTAA sugerties spektrai aliejų švitinant mėlyną šviesą skleidžiančiu diodu

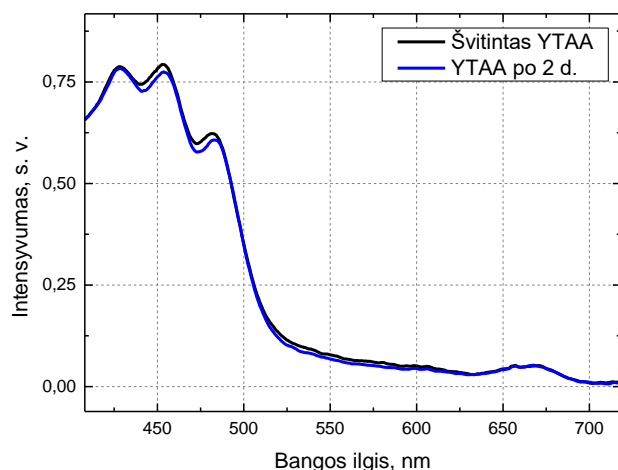
Palyginus švitinimo ir senėjimo metu matytus juostos augimus 520-650 nm spektro dalyje, matosi, kad susidariusio fotoproducto juostų formos abiem atvejais yra labai panašios. Kadangi švitinant YTAA jo spektras blunka žymiai didesniu tempu, santykiname spektre (3.5 pav.) galima pastebėti „išgraužas“, kurios atitinka feofitino-a juostos maksimumus. Nepaisant to, galima teigti, kad abiejų eksperimentų metu susidarė toks pat fotoproductas.

Susidariusio fotoproducto spektrinė forma yra labai panaši į porfirino juostos formą [31], tai kyla hipotezė, kad tokie produktai gali gautis oksiduojant ir/arba redukuojant feofitino-a jį paveikus šviesa ir aplinkoje esant specifiniams oksidatoriams ar reduktoriams, taip susidaro fotoproductas, kurio spektrinės juostos forma yra panaši į porfirino [32]. Tokie produktai dažniausiai susidaro, kai chlorino tipo molekulės yra agreguotoje būsenoje [17].

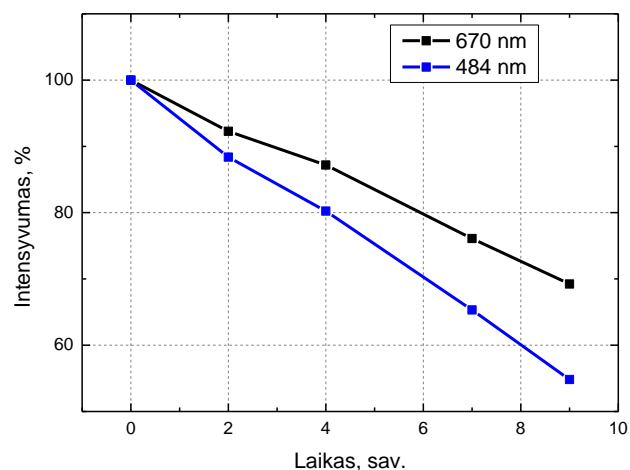
Tačiau yra tikimybė, kad susidaro ir bilirubino tipo fotoproductai (1.4 pav) [17]. Kadangi tokio tipo pigmentai yra labai nestabilūs ir greitai suyra į atskiras pirolo žiedų kombinacijas, kurios sugeria šviesą UV srityje. Tokie pat rezultatai buvo pastebėti ir YTAA bandiniuose (3.9 pav.). Švitintus YTAA bandinius pamatavus po 2 d. buvo matomas fotoproducto juostos intensyvumo mažėjimas.



**3.8 pav.** YTAA sugerties spektrai stebint senėjimo procesą



**3.9 pav.** *YTAA bandinio susidariusio fotoprojekto juostos intensyvumo mažėjimas*



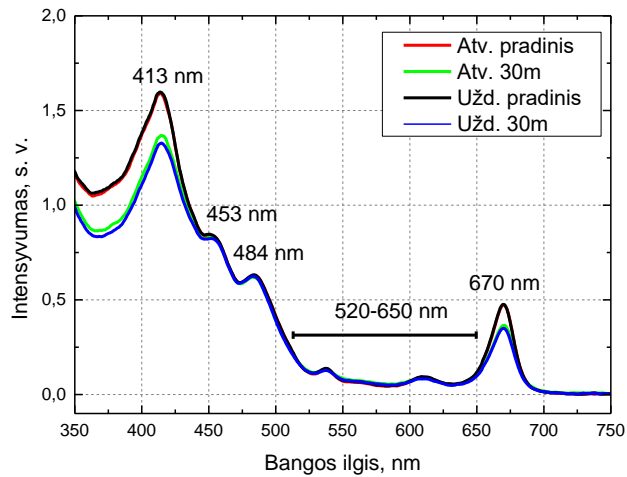
**3.10 pav.** *670 nm ir 484 nm juostų intensyvumo procentinis pokytis senėjimo proceso metu*

3.10 pav. galima matyti, kad senėjimo proceso metu  $\beta$ -karotino 484 nm juostos intensyvumas mažėja greičiau nei feofitino-a. Tačiau švitinimo metu karotinoidų juostos intensyvumas beveik nesikeičia. Tai galėtų reikšti, kad reakcijose, kurios vyksta švitinimo metu,  $\beta$ -karotinas nedalyvauja ir savo kaip antioksidanto vaidmens neatlieka. YTAA senėjimo metu, kuris yra žymiai lėtesnis nei švitinimo metu vykstančios reakcijos, turėtų vyrauti kiti procesai, kuriuose dalyvauja ir  $\beta$ -karotinas. Jis apsaugo YTAA nuo oksidacijos.

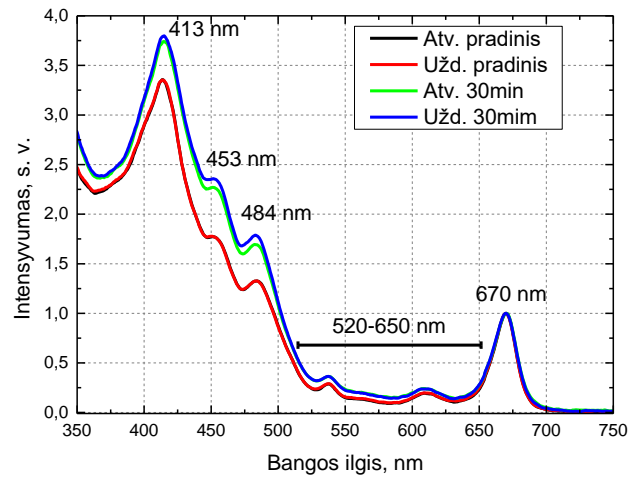
### 3.2 Skirtingos švitinimo sąlygos ir oksidaciniai produktai

Blukimo efektas taip pat buvo stebimas dviejuose YTAA mėginiuose su skirtingomis švitinimo sąlygomis: vienas buvo švitinamas atviroje vonelėje, kitas uždaroje kiuvetėje. Švitinant šiuos du mėginius buvo gauti panašūs rezultatai kaip ir ankstesniame YTAA blukimo eksperimente. Tačiau iš bandinio, švitinto atviroje vonelėje, spektro (3.11 pav.) galima pastebėti, kad feofotino-a juostos intensyvumas sumažėjo mažiau nei bandinyje, švitintame uždaroje kiuvetėje. Bandinys, švitintas vonelėje, buvo nuolatos maišomas ir susidaręs fotoproduktas galėjo labiau išsisklaidyti po visą bandinio tūrį, o bandinys uždaroje kiuvetėje buvo švitinamas lokaliai ir dėl lėtos difuzijos uždareme YTAA bandinyje galima pastebėti sąlyginai didesnę blukimo efektą.

Sunormavus YTAA bandinių sugerties spektrus į 670 nm maksimumą (3.12 pav.) galima pastebėti, kad 350-650 nm spektro dalis abiejuose švitintuose mėginiuose yra iškilusi daugiau nei pradiniuose spektruose. Taip yra dėl to, kad  $\beta$ -karotinas nedalyvauja ar dalyvauja nežymiai švitinant YTAA ir jo spektrinės juostos intensyvumas nekinta. Abiejuose švitintuose mėginiuose susidariusio fotoprojekto juostos intensyvumas yra toks pat, kas leidžia teigti, kad skirtingos švitinimo sąlygos neturėjo tam įtakos.

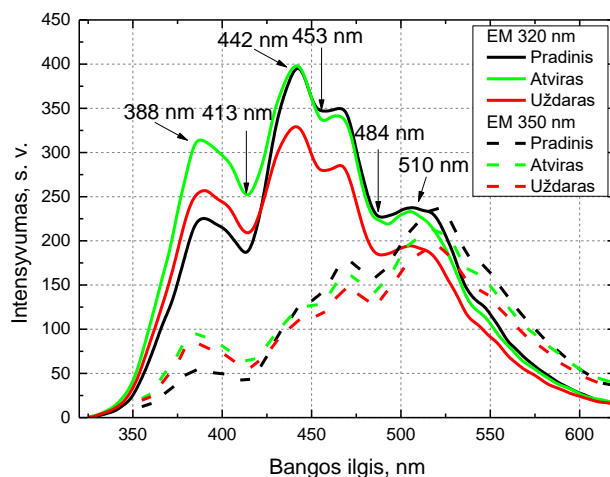


**3.11 pav.** YTAA sugerties spektrų kitimas juos švitinant skirtingomis sąlygomis



**3.12 pav.** Sugerties spektrų normavimas į 670 nm maksimumą

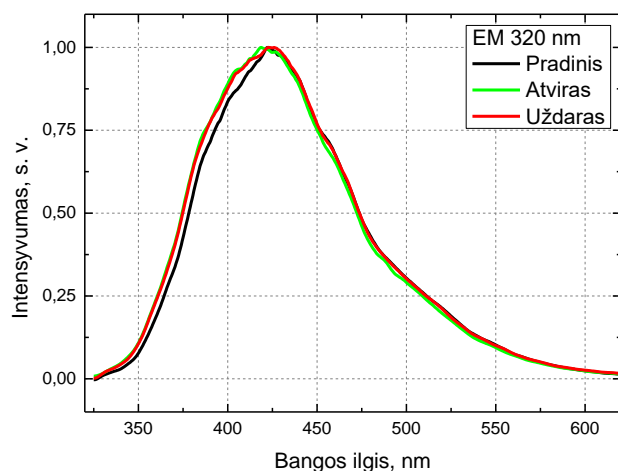
YTAA fluorescencijos spektruose, kurie buvo matuoti ties 320 nm ir 350 nm (3.13 pav.), galima išskirti tris charakteringus maksimumus (388 nm, 442 nm ir 510 nm). Kai kuriuose straipsniuose yra manoma klaidingai, kad šios juostos, esančios raudonoje spektro pusėje, atitinka vitamino E fluorescencijos juostas [33]. Tačiau kadangi šie (3.13 pav.) spektrai yra stipriai paveikti vidinio filtro efekto, gauti maksimumai negali būti laikomi charakteringais, taip pat tokoferolinių junginių fluorescencijos maksimumai yra apie 320 nm [17]. Kai kuriuose straipsniuose buvo minima, kad čia gali būti vitamino E oksidacinių produktų charakteringos juostos, bet vitamino E oksidaciniai produktai yra nefluorescuojančios medžiagos [34].



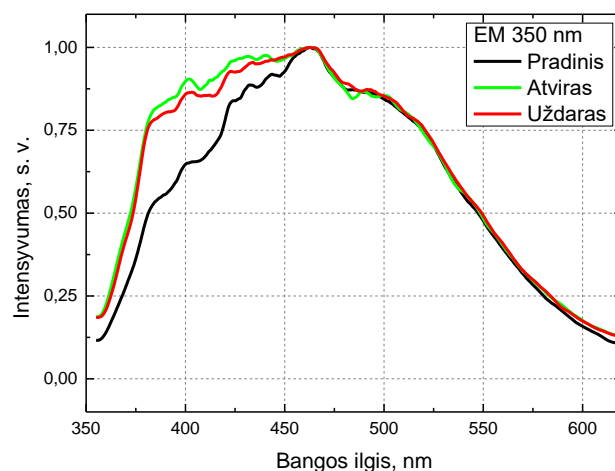
**3.13 pav.** YTAA fluorescencijos spektrai, žadinti ties 320 nm ir 350 nm

Iš koreguotų fluorescencijos spektrų galima matyti, kad tiek 3.14 pav., tiek 3.15 pav. vaizduojamuose spektruose yra intensyvumo augimas trumpųjų bangų pusėje. Kadangi fenolinių junginių fluorescencija čia neturėtų būti užfiksuota [17], o oksidacinių produktų fluorescencijos

spektras dažniausiai slenkasi į raudonąją pusę, tai galima teigti, kad 3.14 pav. ir 3.15 pav. yra matoma nesočiųjų riebalinių rūgščių oksidacinių produktų augimas.



**3.14 pav.** Koreguoti YTAA fluorescencijos spektrai, žadinti ties 320 nm



**3.15 pav.** Koreguoti YTAA fluorescencijos spektrai, žadinti ties 350 nm

### 3.3 Fotocheminių reakcijų, vykstančių YTAA, mechanizmas

Paveikus YTAA šviesa tuo pat metu gali vykti nemažai fotocheminių reakcijų. Jeigu aplinkoje yra deguonies molekulių, gali vykti antro tipo fotosensibilizuota reakcija. Sužadinta tripletinės būsenos feofitino-a molekulė gali perkelti deguonies molekulę į singuletinę būseną. Šioje būsenoje esanti deguonies molekulė yra labai chemiškai aktyvi ir sąveikaudama su nesočiosiomis riebalinėmis rūgštimis gali sudaryti jų hidroperoksidus.

Tačiau kai aplinkoje yra mažai deguonies molekulių, sužadinta feofitino-a molekulė gali inicijuoti pirmo tipo fotosensibilizuotą reakciją. Šios reakcijos metu feofitinas reaguodamas su aplinkinėmis molekulėmis gali sudaryti substrato ir savo paties radikalus. Susidarę radikalai irgi gali reaguoti su nesočiosiomis riebalinėmis rūgštimis ir taip sudaryti jų hidroperoksidus. Taip pat reaguojant sužadintam feofitinui-a su oksidatoriais ar reduktorais gali formuotis jo fotoproduktai. Pvz., feofitinas-a gali oksiduotis ir sudaryti porfirino tipo fotoproduktus, dėl kurių yra stebimas sugerties padidėjimas 520-650 nm srityje (3.7 pav).

Taip pat švitinant feofitiną-a gali susidaryti bilirubino tipo fotoproduktas. Šis fotoproduktas yra labai nestabilus, egzistuoja tik trumpą laiką ir greitai suyra į UV srityje šviesą sugeriančias atskirų pirolo žiedų kombinacijas, dėl to matomas fotoprodukto juostos intensyvumo mažėjimas per porą dienų (3.9 pav.).

Galiausiai feofitino-a makrociklas švitinimo metu suskyla į nedidelius darinius, sugeriančius šviesą UV spektro srityje. Dėl to matomas blukimo efektas YTAA sugerties spektre ties feofitino-a sugerties juosta. Suirę dariniai gali būti atskiri molekulę sudarantys pirolo žiedai ar jų junginiai.

## **Išvados**

1. Reakcijose, kurios vyksta švitinimo metu, karotinoidai nedalyvauja ir savo kaip antioksidanto vaidmens neatlieka, priešingai nei ypač tyro alyvuogių aliejų senėjimo metu vykstančiose reakcijose, kuriose jie apsaugo alyvuogių aliejų nuo oksidacijos.
2. Paveikus ypač tyrą alyvuogių aliejų šviesa yra tikimybė susidaryti trijų tipų feofitino-a fotoproduktams: UV spinduliuotės srityje sugeriančioms atskirų pirolo žiedų kombinacijoms, bilirubino tipo pigmentui ir oksiduotam/redukuotam feofitino-a fotoproduktui.
3. Švitinimo metu feofitinas-a inicijuoja nesočiųjų riebalinių rūgščių hidroperoksidų susidarymą.

## Literatūros šaltinių sąrašas

- [1] C. Lazzerini, V. Domenici. Pigments in Extra-Virgin Olive Oils Produced in Tuscany (Italy) in Different Years. *Foods*, 6, 25, (2017).
- [2] F. Guimet, J. Ferré, R. Boqué, F. Xavier Rius. Application of unfold principal component analysis and parallel factor analysis to the exploratory analysis of olive oils by means of excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 515:75–85, (2004).
- [3] B. Baccouri, S. B. Temime, E. Campeol, P. L. Cioni, D. Daoud, M. Zarrouk. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils from five new cultivars. *Food Chemistry*, 102:850–856, (2006).
- [4] F. Caponio, M. T. Bilancia, A. Pasqualone, E. Sikorska, T. Gomes. Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *The journal European Food Research and Technology*, 221:92–98, (2005).
- [5] M. Ricca, V. Fodera, V. Vetri, G. Buscarino, M. Montalbano, M. Leone. Oxidation Processes in Sicilian Olive Oils Investigated by a Combination of Optical and EPR Spectroscopy. *Journal of Food Science*, 00:0, (2012).
- [6] E. Choe, D. B. Min. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Journal of Food Science*. 5:169–86, (2006).
- [7] N. A. M. Eskin. Borage and evening primrose oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110(7): 651-654(2008).
- [8] A. Giuliani, L. Cerretani, L. Cichelli. Chlorophylls in Olive and in Olive Oil: Chemistry and Occurrences. *Food Science and Nutrition*, 51:678-690, (2011).
- [9] G. Yildirim. Effect of Storage Time on Olive Oil Quality. The Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir, İzmir , (2009).
- [10] M. Mowatt. In Search of Counterfeit Olive Oil Using the Spark Spectral Sensor. *Applications Scientist, Ocean optics*, 1-4, (2015).
- [11] R. Rotomskis, S. Bagdonas, J. Valančiūnaitė. *Biofotonika*. Vilnius, Vilniaus universiteto leidykla, (2007).
- [12] M. Vernet, C. J. Lorenzen. The relative abundance of pheophorbide a and pheophytin a in temperate marine waters. *Limnology and Oceanography*, 32(2):352-358, (1987).
- [13] R. Rotomskis, G. Streckytė. *Fluorescencinė diagnostika biomedicinoje*. Vilnius, VU leidykla, (2007).
- [14] R. Rotomskis, G. Streckytė, S. Bagdonas, J. Venius. *Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija)*. Vilnius, VU leidykla, (2008).
- [15] G. Streckytė, J. Didžiapetrienė, V. Kirvelienė, S. Bagdonas, R. Rotomskis. *Fotosensibilizacija biosistemose: taikymas ir perspektyvos*. Vilnius, Vilniaus Universiteto leidykla, (2008).

- [16] R. Rotomskis, G. Streckytė, L. Gričiūtė. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai. Vilnius, VU leidykla, (2002).
- [17] R. Rotomskis, S. Bagdonas, G. Streckytė. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 33:61-67, (1996).
- [18] R. B. Martí, J. F. Baldrich. Olive oil characterization using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. *Universitat Rovira i Virgili, Tarragona*, (2005).
- [19] E. Psomiadou, M. Tsimidou. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46:5132–5138, (1998).
- [20] M. Rahmani, A. S. Csallany. Role of minor constituents in the photooxidation of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(7):837-843, (1998).
- [21] A. Cichelli, G. P. Pertesana. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: Chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046(1-2):141-146, (2004).
- [22] K. Papadopoulos, T. Triantis, E. Yannakopoulou, A. Nikokavoura, D. Dimotikali. Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 494:41–47, (2003).
- [23] E. Sikorska, I. Khmelinskii, M. Sikorski. Analysis of Olive Oils by Fluorescence Spectroscopy: Methods and Applications. *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, 63-88, (2012).
- [24] PubChem, Open chemistry database, National center for biotechnology information, (2016). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12085802>
- [25] C. Lazzerini, M. Cifelli, V. Domenici. Pigments in Extra-Virgin Olive Oil: Authenticity and Quality, *Intech*, 99-114, (2016).
- [26] PubChem, Open chemistry database, National center for biotechnology information, (2016). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5459387>
- [27] M. J. Moyano, F. J. Heredia, A. J. Melendez-Martinez. The Color of Olive Oils: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis. *Comprehensive reviews in food science and safety*, 9:278-291, (2010).
- [28] PubChem, Open chemistry database, National center for biotechnology information, (2016). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281243>
- [29] PubChem, Open chemistry database, National center for biotechnology information, (2018). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445639>



- [30] A. Cichelli, G. P. Pertesana. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography*, 1046:141–146, (2004).
- [31] A. Struck, E. Cmiel, S. Schneider, H. Scheer. Photochemical ring-opening of meso-chlorinated chlorophylls. *Photochemistry and Photobiology*, 51(2):217-222, (1990).
- [32] K.M. Smith. General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. In: *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier, 1-28, (1975).
- [33] M. Zandomenighi, G. Zandomenighi. Comment on Cluster Analysis Applied to the Exploratory Analysis of Commercial Spanish Olive Oils by Means of Excitation-Emission Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(14):5829-5830, (2005).
- [34] D. Pollok, H. U. Melchert. Determination of alpha-Tocopherolquinone in Human Serum Samples by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and On-Line Post-Column Derivatization. *Journal of Chromatography*, 1056(1-2):257-262, (2004).

## Santrauka

Ypač tyras alyvuogių aliejus (YTAA) yra gaminamas iš alyvmedžių uogų (lot. *olea europaea*), dėl šios priežastis jame yra didelis kiekis nesočiųjų rūgščių ir biologiškai aktyvių molekulių. Be to tarp skirtingų augalinių aliejų rūšių YTAA turi didžiausią bioaktyvių medžiagų kiekį, dėl to YTAA yra laikomas sąlyginai aukštesnės kokybės nei kiti augaliniai aliejai. Alyvuogių aliejaus kokybė priklauso nuo įvairių faktorių: regiono, kur auginamos alyvuogės, vaisių prinokimo lygio, sandėliavimo, apdorojimo ir kt. Tinkamos laikymo sąlygos apsaugo aliejų nuo oksidacinių procesų. Oksidacija alyvuogių aliejuje daugiausia vyksta dėl hidrolizuoto degradavimo, auto- ir foto- oksidacijos.

Tokios medžiagos kaip fosfolipidai, tokoferoliai, karotinoidai ir chlorofilai gali veikti kaip anti- arba pro- oksidantai, dėl to gali kisti alyvuogių aliejaus oksidacinis stabilumas. YTAA galima rasti natūralių fotosensibilizatorių, kaip chlorofilų ar jų produktų. Šie sensibilizatoriai yra pagrindinė priežastis, dėl kurios aliejuje vyksta fotooksidacija, o jame esantys antioksidantai ( $\beta$ -karotinas, luteinas) kuria apsauginį efektą.

Šiame darbe buvo tiriami YTAA esantys pigmentai, jų senėjimo procesai ir antioksidantų poveikis fotovirsmams. Tyrimams buvo pasirinkti keturi komerciškai prieinami YTAA. Matuojant bandinių sugerties, fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrus buvo aiškinamasi, kokie fotovirsmi vyksta YTAA jį švitinant ir vykstant natūraliam senėjimo procesui. Iš fluorescencijos spektrų buvo nustatyta, kad švitinimo metu susidaro riebalinių rūgščių hidroperoksidai, dėl kurių susidarymo keičiasi YTAA skonis ir atsiranda nemalonus kvapas.

Povilas Zdanis

## **Spectrometric analysis of phototransformations of natural pigments in extra virgin olive oil**

### **Summary**

Extra virgin olive oil (EVOO) is produced from the olive trees fruits (lot. *Olea europae*), and due to the high content of monounsaturated fatty acids and other bioactive compounds, EVOO is considered beneficial for human health. Among other types of vegetable oils EVOOs are those with the highest content of compounds with bioactive properties. EVOO's quality depends on various factors: degree of fruit ripeness, environmental conditions, growing region and techniques of processing and storage. Thus, pigments naturally degrade in oil during storage. The oxidation processes in olive oils are principally due to hydrolytic degradation, auto and photo oxidation. These processes mainly depend on fatty acid composition and on the presence of other bioactive components in EVOO.

Components in EVOO such as phospholipids, carotenoids, tocopherols and chlorophylls can potentially act as anti- or pro-oxidants determining olive oil stability. Photosensitizers in EVOO are the main initiators of the light-induced oxidation, while the presence of antioxidants creates a protective effect.

The purpose of this research was to investigate pigments in EVOOS, their aging processes and the effect of antioxidants on phototransformations. Four commercially available EVOOs was chosen for the experiments. While measuring absorption, fluorescence and excitation spectra of the specimens we have studied the phototransformations occurring while irradiating the samples with a light and also while monitoring aging process in EVOO. While studying fluorescence spectra of EVOO's we have found that the irradiation of EVOO sample leads to the formation of hydroperoxides of unsaturated fatty acids. Which are responsible for the typical unpleasant aroma.