

Određivanje sadržaja polifenola u ekstra djevičanskom maslinovom ulju

Bošković, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:813909>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Andrea Bošković

**Određivanje sadržaja polifenola u ekstra
djevičanskom maslinovom ulju**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fizikalna kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala.

Veliku zahvalu upućujem doc. dr. sc. Cvijeti Jakobušić Brala na stručnom vodstvu te izuzetno velikom strpljenju i razjašnjavanju nejasnoća tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Također zahvaljujem i asistentici dr. sc. Ani Karković Marković na pomoći pruženoj tijekom eksperimentalnog dijela rada dok je doc. dr. sc. Jakobušić Brala bila odsutna.

Iz sveg srca zahvaljujem i ostalim djelatnicima sa Zavoda za fizikalnu kemiju, tehničke podrške, koji su uvijek bili tu kad bi zapelo.

Općenito sam zahvalna svim djelatnicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na nezaboravnih 5 godina ispunjenih brojnim znanjima koja će mi koristiti u daljnjem akademskom životu.

*Zahvalna sam na brojnim prijateljima koji su mi uljepšali dane studiranja. Poglavitito mojim dragim curama iz osnovne i srednje škole, koje su bile i bit će vječna podrška. Zatim divnoj redakciji časopisa *Recipe* koji su mi pomogli saznati kakav je osjećaj osvojiti Rektorovu nagradu te ekipi „S.O.“ na nekim od najljepših provoda u životu.*

Posebne zahvale idu Ani B., Petri i Ani Mariji na svesrdnom pružanju moralne podrške tijekom stresnog razdoblja pisanja diplomskog rada.

Na kraju želim zahvaliti svojoj obitelji, majci Nataši na tjeranju da učimi polažem ispite na vrijeme, tetki Maji na vječnoj podršci uoči ispita, bakama Miri i Olgi na brizi jesam li sita te psu Slavici jer je jednostavno tu.

Diplomski rad, kao i sve što ću postići u životu posvećujem Njemu kojeg više nema, prerano preminulom ocu Danijelu.

Andrea Bošković

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Fenolni spojevi u maslinovom ulju	1
1.2 Biomedicinski učinci polifenola.....	4
1.3 Osnovne metode u ispitivanju kvalitete maslinovog ulja.....	9
1.4 Određivanje sadržaja polifenola u maslinovom ulju	15
1.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti polifenola iz maslinova ulja s DPPH.....	25
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	27
3. MATERIJALI I METODE.....	28
3.1 Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor	28
3.2 Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina u maslinovom ulju.....	28
3.3 Određivanje ukupnih fenola u maslinovom ulju	30
3.4 Određivanje <i>o</i> -difenola u maslinovom ulju	31
3.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti fenolnog ekstrakta maslinovog ulja DPPH metodom	32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1 Rezultati.....	33
4.2 Rasprava	34
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46
7. SAŽETAK/SUMMARY	49
7.1 Sažetak.....	49
7.2 Summary.....	49
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

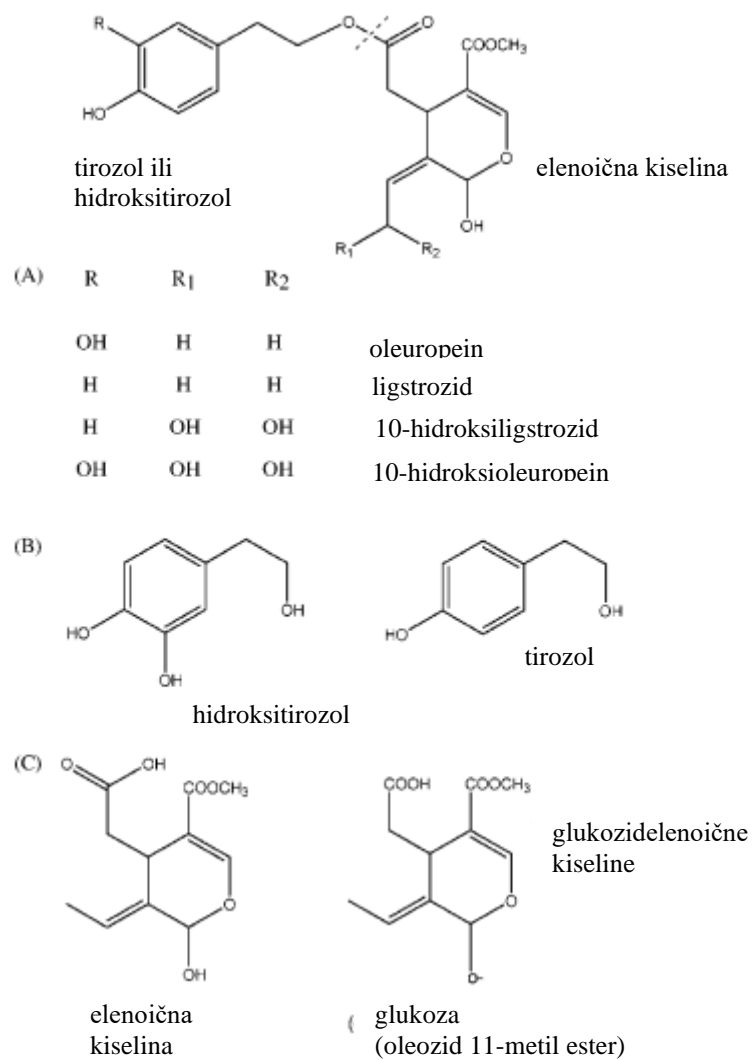
1.1 Fenolni spojevi u maslinovom ulju

Polifenoli, odnosno polarna frakcija fenolnih spojeva maslinovog ulja, sveobuhvatni je naziv za različite spojeve koji se iz njega mogu izolirati korištenjem smjese metanolnog alkohola i vode kao ekstrakcijskog sredstva. S obzirom da maslinovo ulje sve više interesira znanstvenike, kao prehrambeni proizvod koji bi mogao pomoći pri liječenju i prevenciji brojnih komorbiditeta različite etiologije, popis otkrivenih i potencijalno ljekovitih spojeva svake je godine sve duži. Osim djelovanja na zdravlje, doprinose i stabilnosti samog ulja.

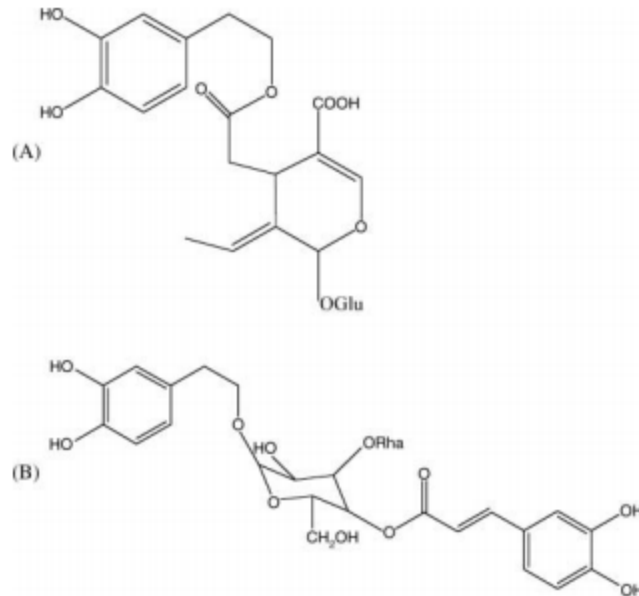
U maslinovom ulju mogu se naći i hidrofilni i lipofilni spojevi. U lipofilne se ubrajaju tokoferoli, a hidrofilni se dijele na fenolne kiseline i alkohole, sekoiridoidei njihove metabolite te lignane (Tripoli i sur., 2005). Pronalaze se i flavonoidi u koje se ubrajaju glikozidiflavonola, antocijani, cijanidini te glikozididelfinidina.

Fenolni alkoholi, s glavnim predstavnicima tirozolum i hidroksitirozolum čine prvu skupinu. Vežanjem različitih šećera nastaju njihovi derivati, obično produkti sekundarnog metabolizma. Primjer za to su sekoiridoidni spojevi, karakteristični za *Oleaceae* porodicu, od kojih su najpoznatiji oleuropein i ligstrozid. U fenolne kiseline ubrajaju se galna kiselina, cimetna kiselina, kavena kiselina, *p*- i *o*-kumarinska i dr.

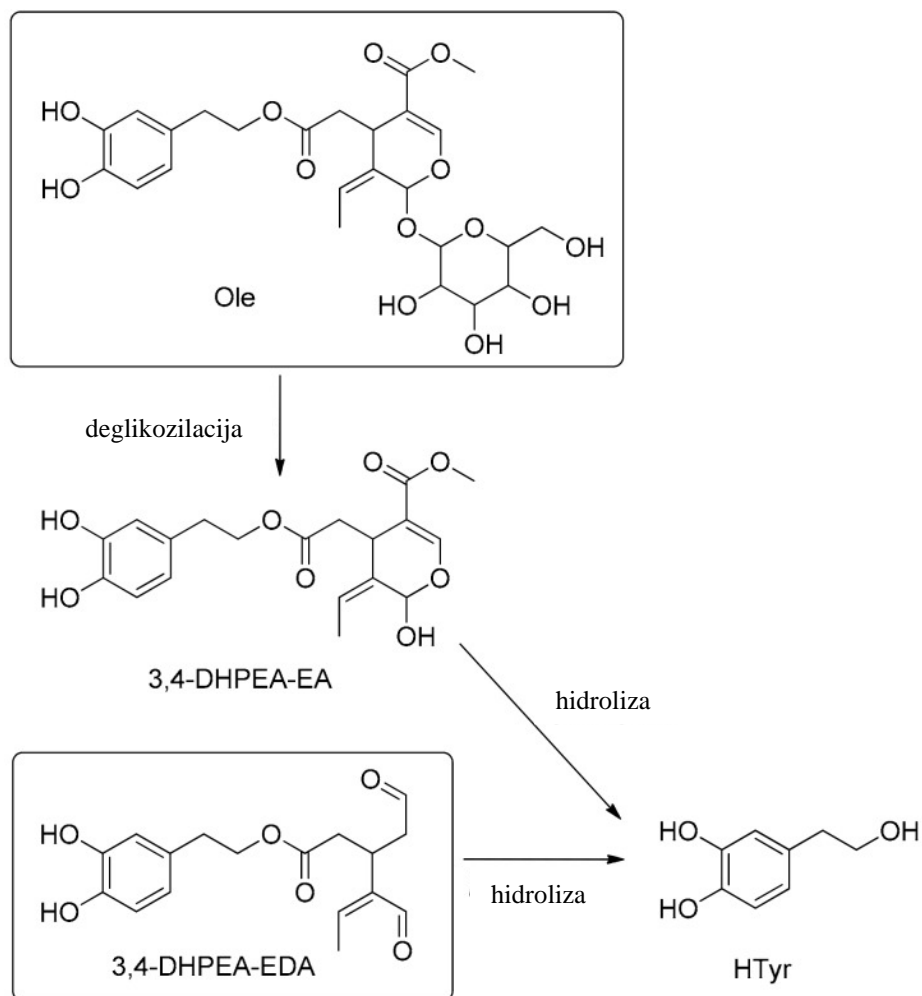
Okarakterizirani su također i lignani s (+)-1-acetoksipinorezinol and (+)-pinorezinol kao predstavnicima (Tripoli i sur., 2005).



Slika 1. Kemijske strukture različitih sekoiridoida. Svima su zajedničke komponente hidroksitirozol i elenoična kiselina (A). Strukture tirozola i hidroksitirozola (B). Strukture elenoične kiseline i njezonogglukozida (C) (Tripoli i sur., 2005).

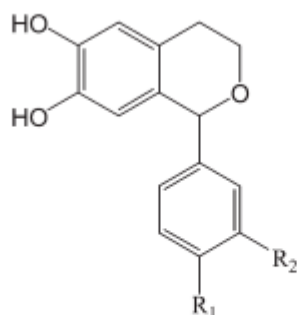


Slika 2. Strukture demetiloleuropeina (A) i verbaskozida (B) (Tripoli i sur., 2005).



Slika 3. Metabolizam oleuropeina. Konačni razgradni produkt je hidroksitirozol koji se izlučuje mokraćom (Karković Marković i sur., 2019).

Također, Bianco i sur. pronalaze novu klasu fenolnih spojeva neobičnog porijekla – hidroksil-izokromane. Tijekom procesa ekstrakcije ulja iz ploda masline, glikozidaze i esteraze cijepaju veće spojeve te se tirozol i hidroksitirozol oslobađaju. Reakcijom s benzaldehidima i vanilinom daju izokromanske spojeve. Dva primjera - 1-fenil-6,7-dihidroksiizokroman i 1-(3“-metoksi-4“-hidroksi)fenil-6,7-dihidroksiizokroman – identificirana su pomoću HPLC-MS/MS te se kvantificiraju u komercijalnim uljima. (Preedy i Watson, 2010) Hidroksi-izokromani se istražuju zbog potencijalnog antiagregacijskog i antioksidacijskog djelovanja.



$R_1=H$

$R_2=H$

$R_1=OH$

$R_2=OCH_3$

Slika 4. Struktura izokromana (Boskou i sur., 2006).

Spoj otkriven prije 20 godina, oleokantal, pokazao je pak slično farmakološko djelovanje kao ibuprofen (nesteroidni protuupalni lijek). Zanimljivo je kod njega što ga se može pronaći samo u svježem ekstra djevičanskom maslinovom ulju, a povezuje ga se i s peckanjem u grlu prilikom njegove konzumacije (Boskou i sur. 2006).

Polifenolni spojevi također pridonose stabilnosti i starosti maslinovog ulja, kao i uvjetima skladištenja. U odstajalom ulju uglavnom prevladavaju slobodni fenoli, dok ih u svježe pripremljenom pronalazimo u obliku kompleksnijih aglikona (Boskou i sur., 2006).

1.2 Biomedicinski učinci polifenola

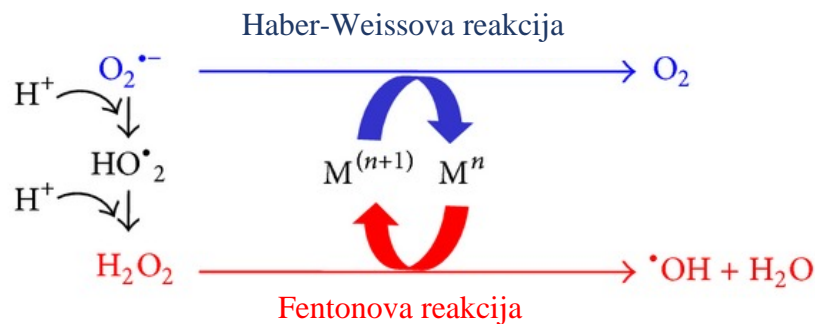
Iako se čovjekov životni vijek u razvijenim zemljama zahvaljujući poboljšanju higijene, izumom cjepiva i općenito širem poznavanju medicine značajno produžio, on ne ostaje imun na bolesti koje danas povezujemo sa životnim stilom i starijom životnom dobi. Neki od primjera su različite kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest tip 2 te neurodegenerativne bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove demencije (Rigacci i Stefani, 2016). U porastu je, nažalost, i

pojava različitih tumora. Ovi su komorbiditeti posljednjih desetljeća pod velikim povećalom istraživača, a danas se fokus s njihovog liječenja prebacuje na prevenciju. „Studija sedam država“, provedena 70-ih godina prošlog stoljeća, pokazala je da je očekivani životni vijek mediteranskih naroda jedan od najviših u svijetu, a incidencija različitih kroničnih inflamatornih bolesti među najnižima. Promatranjem ishrane ovih naroda uočena je masovna redovita konzumacija maslinovog ulja te se upravo njegova prisutnost dovela u vezu s vitalnošću stanovnika Sredozemlja (Parkinson i Cicerale, 2016). Pronađeni su i brojni zapisi iz antičke Grčke u kojima čak i Hipokrat djevičansko maslinovo ulje preporučuje kao terapiju za šezdesetak različitih bolesti. Kasnija istraživanja pokazala su da je upravo fenolna frakcija ta koja bi mogla biti zaslužna za klinički učinak.

Najproučavanije djelovanje fenola iz ulja i drugih prirodnih izvora za ljudski organizam jest antioksidacijsko. Antioksidansi su, kao što je poznato, spojevi koje sprečavaju oksidaciju, proces povezan sa starenjem, degradacijom i nastankom po stanicu toksičnih slobodnih radikala.

Za čovjeka izuzetno bitan negativni učinak oksidativnog procesa jest lipidnaperoksidacija. Taj se proces povezuje s brojnim bolestima upravo zahvaljujući generiranim radikalima. Neki od primjera su dijabetes, tromboza, različite neurodegenerativne te stanične bolesti (uključujući tumore). Do procesa može doći endogeno; metabolizmom u mitohondrijima, peroksisomima i endoplazmatskom retikulumu putem enzima poput citokroma i peroksidaza, ili egzogeno; konzumiranjem nekih ksenobiotika (paracetamol, diklofenak, herbicidi, pesticidi), UV-zračenjem, pušenjem duhana, infekcijom patogenima i dr. (Ayala i sur., 2014) Nedostatak endogenih tokoferola također pogoduje tom procesu. (Chance i sur., 1979) Najpodložnije njihovom štetnom utjecaju su fosfolipidne stanične membrane te membrane organela. Najčešći radikali sadrže kisik u sebi, točnije najreaktivniji hidroksilni OH^\bullet te hidroperoksilni HOO^\bullet . Pojavljuju se i RNS, odnosno dušikove reaktivne specije (NO , NO_2 , ONOO^\bullet) (Repetto i sur., 2012).

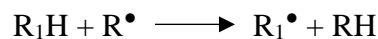
OH^\bullet u organizmu nastaje putem Fentonove reakcije, kad se vodikov peroksid, H_2O_2 , reducira uz pomoć Fe^{2+} koji prelazi u oksidirani oblik Fe^{3+} . Postoji i reakcija suprotnog smjera, Haber-Weissova, u kojoj se Fe^{3+} reducira uz pomoć superoksidnog iona, $\text{O}_2^{\bullet-}$. Osim željeza, u ovom ciklusu mogu sudjelovati i bakar, nikal, kobalt i dr.



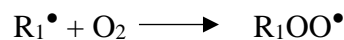
Slika 5. Shematski prikaz nastanka kisikovih reaktivnih specija iz vodikovog peroksida uz pomoć iona prijelaznih metala (Ayala i sur., 2014).

Hidroperoksilni radikal ima važnu ulogu u narušavanju integriteta stanične membrane. Kao intermedijer u nastanku vodikovog peroksida iz superoksidnog iona, jači je oksidans od svog deprotoniranog prethodnika te uspješnije započinje prvu fazu lipidneperoksidacije.

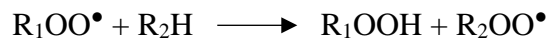
Sami proces počinje inicijacijom u kojem reaktivni radikal oduzima vodik ugljikovom atomu u alifatskom lancu te se stvara lipidni radikal, $R_1\bullet$, po sljedećoj reakciji:



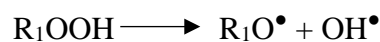
Druga faza propagacije dovodi do nastanka reaktivnog lipidnogperoksiradikala:



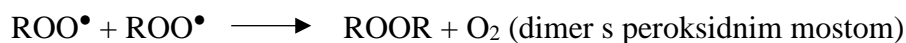
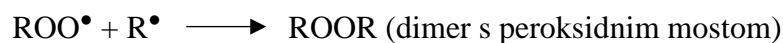
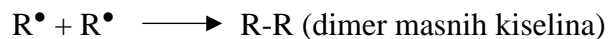
Lančanom reakcijom peroksiradikal oduzima vodik drugom alifatskom lancu analogno prvoj reakciji te se stvara prvi stabilan intermedijer u procesu peroksidacije, a to je hidroperoksid:



Hidroperoksid se raspada ponovno na radikalne produkte:

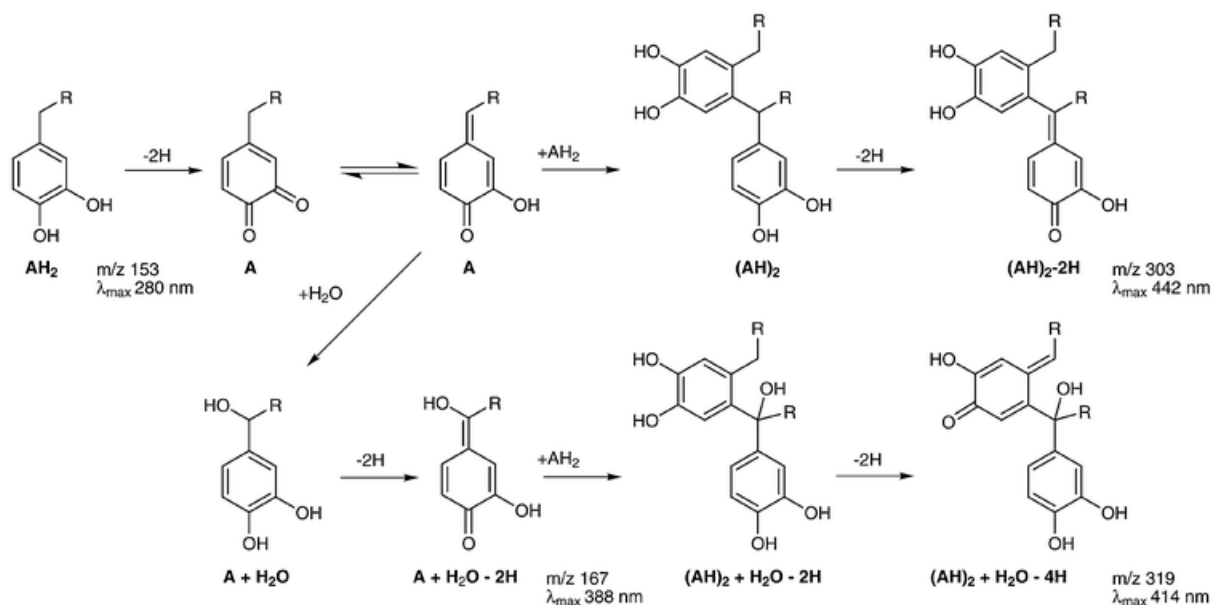


Terminacija, kako joj samo ime kaže, označava kraj lančane reakcije sudarom dvaju radikala koji generira dva nereaktivna produkta (Lushchak i Semchyshyn, 2012):



Antioksidansi, poput vitamina E, zapravo su sudionici terminacijske faze. Naime, njihovi su radikalni oblici stabilni, ne djeluju razarajuće na stanične komponente, te u procesu propagacije doniraju vodik za stvaranje hidroperoksida, dok u procesu anihilacije s drugim lipidnim radikalom stvaraju neki od gore navedenih dimera (Ayala i sur., 2014).

Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva temelji se na njihovoj oksidaciji umjesto ciljane molekule te time sprečavaju nastanak toksičnih nestabilnih slobodnih radikala. Gubljenjem jednog elektrona fenolati anioni prelaze u semikinonski oblik, a odlaskom dva e⁻ iz o- i p-difenola nastaju kinoni (Roche i sur., 2005).



Slika 6. Mehanizam oksidacije hidroksitirozola i stvaranje njegovih dimera (Roche i sur., 2005).

U smjesi koja se sastoji od oksidiranih kinona i neoksidiranih fenola dolazi do lančane reakcije izmjenjivanja elektrona gdje fenoli reduciraju kinonske oblike te nastanu semikinonskiintermedijeri. S obzirom na svoju reaktivnost zbog jednog nesparenog elektrona, među intermedijerima stvaraju se kovalentne veze koje stvaraju semikinonskedimere. Ukoliko se veza nalazi na bilokojem C-atomu iz aromatskog prstena, fenol se regenerira u „normalno“, reducirano stanje.

Fenoli djeluju na brojne enzime, receptore, proteine, signalne puteve, pa čak i na sami kromatin. Primjerice, dokazano je djelovanje oleuropeina (OLE) i hidroksitirozola (HT) na angiogenezu preko ciklooksigenaze-2 (COX-2), proces nastanka novih krvnih žila, izuzetno eksprimiran u tumorima. Hidroksitirozol pokazuje jače antioksidativno djelovanje od OLE (Tuck i Hayball, 2002), dok OLE također navodno inhibira metastaziranje tumora djelovanjem na metaloproteinaze, a moguće je i da djeluje na aromataze, enzime ključne u sintezi estrogena iz androgenih hormona, što je ključno kod primjerice tumora dojki ili jajnika. Potonje je dokazano uspješnim povećanjem senzitivnosti na prvu liniju liječenja raka na dojci, trastuzumab (Mendendez i sur., 2007). Sekoiridoidni spojevi također utječu na aktivaciju gena uključenih u regulaciju starenja stanice te potiču ulazak tumorskih stanica u apoptozu.

Osim potencijalne prevencije tumora, polifenoli su, kako je već navedeno, bitni u sprečavanju nastanka kardiovaskularnih bolesti (KVB). Glavna žrtva kod KVB uvijek je endotel žila, oštećen zahvaljujući hipertenziji, hiperlipidemiji, hiperglikemiji, primjeni nekih lijekova poput antineoplastikadoksorubicina (Andreadou I i sur., 2014) ili samo starenju. Produkcija reaktivnih kisikovih specija (ROS), kao posljedica upalnih stanja izazvanih navedenim situacijama uništava stanice epitela te povećava mogućnost razvoja koronarnih bolesti. Kako je navedeno, polifenoli svojim antioksidacijskim djelovanjem umanjuju toksično djelovanje radikala te posredno sprečavaju lipidnuperoksidaciju nezasićenih masnih kiselina, uvelike nađenih u membranama stanica. Osim hvatanja radikala, djeluju na lučenje različitih proupalnih citokina, primjerice IL-6 i IL-8, za koji se smatra da igra veliku ulogu u stvaranju aterosklerotskih plakova (Rigacci i sur., 2016). OLE i HT imaju najveću anti-aterosklerotsku aktivnost te je zamijećena njihova uloga u sprečavanju ishemijskih događaja kod štakorskih srca te širenja oštećenja tkiva koje je pogodio infarkt kod zečeva. Zečevima su također smanjene razine triglicerida i kolesterola. Smatra se da je to smanjenje potaknuto djelovanjem polifenola na ekspresiju gena povezanih s migracijom kolesterola iz stanice na HDL ili pak povećanje stabilnosti i veličine HDL čestica. Kardioprotektivno je i optimiziranje iskorištenja energije srčanog mišića poboljšanom oksidacijom masnih kiselina, kao i smanjenje oksidacijskog stresa u miocitima. U prethodnom poglavlju spomenuti oleokantal podjednako utječe na enzime ciklooksigenaze 1 i 2, dakle posjeduje i antiagregacijska i protuupalna svojstva. Dapače, pokazao je jače djelovanje od ibuprofena u ekvimolarnoj količini. Supresijom proupalnog medijatora, inducibilnog dušikovog oksida (iNOS), oleokantal bi mogao spriječiti razvoj degenerativnih bolesti zglobova (Parkinson i Cicerale, 2016).

Protuupalno djelovanje polifenola pozitivno utječe i na razvoj jedne od bolesti sve češće pojavnosti, a to je šećerna bolest tip 2, kao i komorbiditete koji se vežu uz nju: metabolički sindrom, nealkoholna masna jetra čija progresija može dovesti i do razvoja nealkoholnog steatohepatitisa nakupljanjem masnoća u njoj. Antidijabetičko djelovanje, osim suprimiranja inflamatornih procesa, očituje se u smanjenju nakupljanja amiloidnih plakova na β -otočiće u gušterači i padu razine glukoze te već spomenutog kolesterola u krvi. Također dolazi do promjena u genskoj regulaciji nastanka inzulinske rezistencije, glavnog okidača u nastanku ŠBT2. Reducirana je i apsorpcija ugljikohidrata iz lumena crijeva. Zanimljivo je da je u jednoj studiji suplementacija OLE-om pokazana kao beskorisna u smanjenju tjelesne mase, dok su u drugim istraživanjima dokazani anoreksički efekti maslinova ulja, vjerojatno zahvaljujući regulaciji glukoze i povećanju metabolizma masnih kiselina (Rigacci i sur., 2016).

Amiloidniplakovi, osim u gušterači, pronađeni su i u mozgu pacijenata oboljelih od Alzheimerove demencije te Parkinsonove bolesti. Iako se o njima još uvijek relativno malo zna, poznato je da ove nakupine pogrešno smotanih proteina svojom citotoksičnošću otežavaju normalan rast i razvoj stanica. Pretpostavlja se da je i tu riječ o inzulinskoj rezistenciji te je čak postojalo govora da se Alzheimerova bolest nazove i šećernom bolesti tipa 3. Shodno tome, logično je razmišljati kako bi polifenoli mogli pozitivno djelovati i na prevenciju tih stanja. Doista, OLE i oleokantal pokazali su uspješno ometanje nakupljanja amiloida i tau proteina (Rigacci i sur, 2016). OLE putem AMPK aktivira autofagiju, raščišćava plakove te smanjuje upalni odgovor. Posljedično, vraćena je aktivnost astrocita, kao i poboljšana memorija kod miševa. Neke pak druge studije pokazuju da je oleokantal taj koji povećava čišćenje, dok OLE smanjuje produkciju A β proteina, glavnih sastavnica plakova (Rigacci i sur., 2016).

1.3 Osnovne metode u ispitivanju kvalitete maslinovog ulja

S obzirom na rast svijesti o benefitima maslinovog ulja, potražnja postaje sve veća, a zahtjevi sve rigorozniji što ima utjecaja i na cijenu proizvodnje. Djevičansko maslinovo ulje u pravilu zahtijeva veću potrošnju novca u odnosu na ulja iz drugih biljaka, što slabije stojeće proizvođače ponekad tjera na očajničke poteze, poput miješanja s uljem komina maslina, rezidualnim uljem preostalim od rafiniranja ili pak sintetičkim uljem dobivenim od masnih kiselina kao nusprodukata također tijekom rafiniranja. Ovakvi postupci nisu samo prevara u ekonomskom smislu, već i imaju opasan utjecaj na zdravlje. Tako je poznat slučaj TOI (*toxic oils syndrome*) u Španjolskoj iz 1981. godine, koji je kod više od 20 000 ljudi uzrokovao mijalgije, pulmonarne infiltrate i povećanu eozinofiliju. 300 ljudi je umrlo, a brojne su i kasnije razvijene kronične bolesti (Gelpi i sur., 2012).

Zbog toga sastavljeno je nekoliko pravilnika koji zadaju limite različitim karakteristikama maslinovog ulja: Codex Alimentarius, European Commission (EC) i International Olive Oil Council (IOOC). Limiti su uglavnom slični, ali postoje neke razlike. Primjer su različite članice Europske Unije koje zbog drukčijih klimatskih uvjeta u kojima se uzgajaju masline dobivaju kultivare nejednakih svojstava, a samim time i različitog sastava ulja. Također, Codex Alimentarius ne sadrži regulative za ulja koja nisu prikladna za humanu upotrebu (Boskou i sur., 2006).

Tablica 1. Kategoriziranje maslinovog ulja prema različitim pravilnicima, sukladno količini slobodnih masnih kiselina, izraženoj kao % oleinske kiseline.

Kategorije	Definicije prema EC, IOOC i Codex Alimentarius
ekstra djevičansko maslinovo ulje	djevičansko maslinovo ulje sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 0.8
djevičansko maslinovo ulje	djevičansko maslinovo ulje sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 2.0
obično djevičansko maslinovo ulje	djevičansko maslinovo ulje sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 3.3
lampante djevičansko maslinovo ulje	djevičansko maslinovo ulje sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, višim od 3.3
rafinirano maslinovo ulje	ulje dobiveno iz djevičanskog maslinovog ulja, rafinirano tako da je sadržaj slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 0.3, a prirodni gliceridni sastav je očuvan
maslinovo ulje	ulje dobiveno miješanjem rafiniranog i djevičanskog maslinovog ulja sa sadržajem masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 1.0
sirovo ulje komina maslina	ulje dobiveno iz komine s otapalom prikladnim prema trenutnim parametrima regulacijskih tijela
rafinirano rezidualno maslinovo ulje	ulje dobiveno rafiniranjem ulja iz komina maslina s očuvanim prirodnim gliceridnim sastavom te sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 0.3
rezidualno maslinovo ulje	ulje dobiveno stapanjem rafiniranog rezidualnog s djevičanskim uljem, sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, gledano po % oleinske kiseline, do 1.0

Na temelju zadanih parametara određuje se kvaliteta maslinovog ulja. U pravilu, određuju se hidrolitička te oksidativna aktivnost prilikom ekstrakcije iz ploda, prerađivanja, ali i čuvanja. Sve organizacije uzimaju u obzir sljedeće parametre:

- određivanje slobodnih masnih kiselina
- peroksidni broj
- apsorbancije unutar UV spektra
- određivanje organoleptičkih svojstava
- određivanje halogeniranih otapala

Osim njih, IOOC i Codex Alimentarius zahtijevaju određivanje topljivih onečišćenja, metala i neosapunljivih tvari, dok EC zanima i sadržaj ulja u reziduama ulja komina maslina (Boskou i sur., 2006).

Sadržaj slobodnih masnih kiselina

Najstariji parametar, sadržaj slobodnih masnih kiselina, određuje se titracijom s lužinom, primjerice kalijevim hidroksidom. Otopina može biti u vodenom ili etanolnom mediju. U propisima se limiti razlikuju za pojedine kategorije, ali ne previše. Unatoč potrebi za prilagođavanjem limita zbog razlika u kultivarima, sva svježe ekstrahirana ulja iz zdravih plodova pokazuju nisku razinu oslobođenih kiselina iz gliceridnog oblika (Boskou i sur. 2006). Međutim, pljesnjivi plodovi ili oni zaraženi maslininom muhom (*Bactrocera oleae*), uz paunovo oko i maslininim moljcem najprisutnijim nametnikom na maslinama u Republici Hrvatskoj, (<https://www.chromos-agro.hr>) zbog aktivnih hidrolitičkih enzima sadrže više slobodnih kiselina od predviđenog te takva ulja nisu prikladna za konzumaciju.

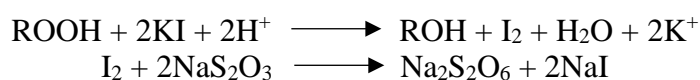
Tablica 2. Limiti za sadržaj slobodnih masnih kiselina, izraženih kao % oleinske kiseline, prema pojedinom pravilniku; nl = nema limita

Kategorije	IOOC	Codex Alimentarius	EC
ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0.8	≤ 0.8	≤ 0.8
djevičansko maslinovo ulje	≤ 2.0	≤ 2.0	≤ 2.0
obično djevičansko maslinovo ulje	≤ 3.3	≤ 3.3	-
lampante djevičansko maslinovo ulje	> 3.3	-	-
rafinirano maslinovo ulje	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3
maslinovo ulje	≤ 1.0	≤ 1.0	≤ 1.0
sirovo ulje komine	nl	-	nl
rafinirano rezidualno maslinovo ulje	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3
rezidualno maslinovo ulje	≤ 1.0	≤ 1.0	≤ 1.0

Peroksidni broj

Peroksidni broj potrebno je odrediti zbog pretežno nezasićenih masnih kiselina koje čine kiselinski dio gliceridnih estera. Zahvaljujući nezasićenim vezama u alifatskom lancu, podložne su djelovanju oksidacije, što naposljetku dovodi do nastanka lipidnihhidroperoksida, ROOH, koji se preko Fentonove reakcije, uz oksidaciju kationa željeza ili bakra, pretvaraju u alkoksi radikale. Radikali zbog viška elektrona razaraju osnovne stanične strukture, ponajviše proteine, a mogu djelovati i mutageno uz pomoć mijenjanja stabilnosti DNA. Terminacija procesa peroksidacije završava asocijacijom dvaju radikala te stvaranjem stabilnih adukata. Također, mogu nastati ciklički spojevi te polinezasićeni produkti.

Lipidnaperoksidacija bit će učestaliji proces što je skladištenje ulja slabije kvalitete – izloženost vlazi, zraku, svjetlosti i duže stajanje pridonose njezinoj pojavi. Peroksidni se broj mjeri jodometrijski – u smjesu otapala octene kiseline/kloroforma rasprši se ulje te se doda otopina kalijevog jodida, KI, u suvišku. Kao produkt nastaje elementarni jod, I₂, koji se titrira otopinom natrijeva tiosulfata. Jednadžba ide ovako:



Vrijednost peroksidnog broja izražava se u miliekvivalentima kisika po kilogramu ulja (meqO₂/kg). Limit za djevičansko ulje je 20, 5 za rafinirano te 15 meqO₂/kg za smjese djevičanskog ulja s onim iz komina maslina te rafiniranim uljem (Boskou i sur., 2006).

Apsorbancija u UV spektru

Stupanj oksidacije može se odrediti i mjerenjem apsorbancije u UV spektru. Specifične apsorbancije, K , određuju se pri apsorpcijskim maksimumima konjugiranih diena i triena, otprilike 232 i 270 nm. Nastanak diena i triena također je jedan od mogućih ishoda lipidneperoksidacije (nastanak radikala nije nužno jedini rezultat). Moguće je da pri 270 nm apsorbiraju i produkti prisutni zahvaljujući procesima obrade ulja. Osim K_{232} i K_{270} često se određuje i ΔK prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta K = K_{\max} - [1/2(K_{\max+4} + K_{\max-4})]$$

K_{\max} je specifična apsorbancija pri 270 nm (Boskou i sur., 2006).

Organoleptička svojstva

Osim svojstava koja se mogu numerički limitirati, postoje i ona koja na drugi način pokazuju bolju, odnosno slabiju kvalitetu ulja. Zato regulatorna tijela propisuju i njihovu senzoričku evaluaciju. Mjerni instrument u ovom su slučaju – ljudi. Izabere se 8 do 12 osoba istreniranih da razlikuju dobro od lošeg svojstva te upoznatih sa specifičnim rječnikom kojim se ona mogu opisati. Uvjeti testiranja strogo su kontrolirani: određena je temperatura uzorka, njegov volumen, kao i oblik, volumen i boja čašica u kojima se on nalazi. Regulirani su i uvjeti u sobi za kušanje – njezina vlaga i temperatura.

Uzorci se isprobavaju nasumičnim redosljedom, a ispitanici dobiju skalu na kojoj s ocjenama 0-10 procijene njihov intenzitet. Rezultati se statistički obrađuju, a njihov medijan određuje kategoriju ulja. Ona s etiketom ekstra djevičanskih i djevičanskih maslinovih ulja moraju imati medijan ocijenjenih defekata jednak 0, a voćnu vrijednost veću od 0 (Boskou i sur. 2006).

Halogenirana otapala

Kloroform i tetrahidroetilen otapala su korištena tijekom ekstrakcije te se mogu naći u tragovima u djevičanskim maslinovim uljima. Sadržaj im se određuje uz pomoć plinske kromatografije, GC, spregnute s detektorom hvatanja elektrona, ECD ili direktnim

injektiranjem ulja u kolonu za plinsku kromatografiju u posebnu pretkolonu. Limit za pojedino halogenirano otapalo iznosi 0.1 ppm, a sveukupna onečišćenja ne smiju premašiti 0.2 ppm (Boskou i sur. 2006).

Metali

Porijeklo metala u maslinovom ulju raznovrsno je. Neki potječu endogeno iz maslina kao kofaktori biljnih enzima uključenih u metabolizam, zatim ih možemo naći u tlu na kojem su kultivari uzgajani, bilo iz pesticida, bilo kao prirodnog sastojka tla, a najviše ih je ipak došlo iz samo procesa prerade, što iz različitih otapala, što iz posuda u kojima se pročišćavanje odvijalo.

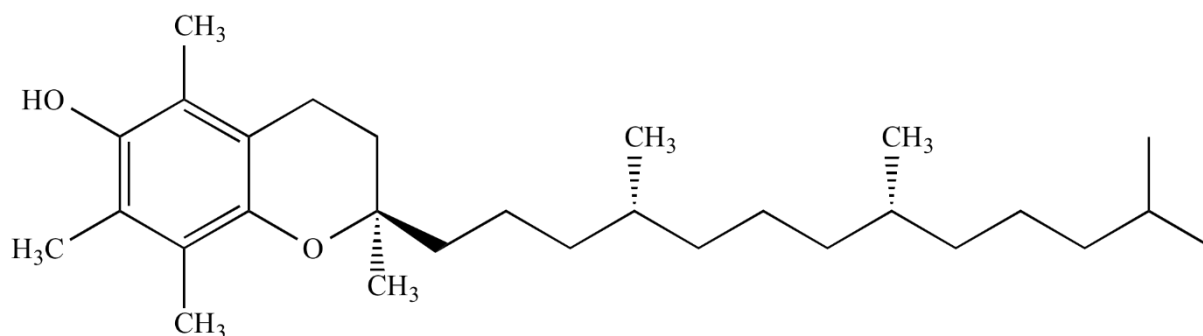
Najzastupljeniji metal je željezo, a mogu se naći bakar, cink, aluminij, nikal, mangan, kobalt, krom, olovo, živa i kadmij. U rafiniranim uljima razina je niža nego u ekstra djevičanskim. Prisustvo prijelaznih metala, poput željeza i bakra, može utjecati na stabilnost ulja zbog njihove katalitičke uloge kod tranzicije hidroperoksida u alkoksi radikale.

Glavna metoda određivanja onečišćenjima metala je atomska apsorpcijska spektrometrija, AAS. Njezin je princip uz pomoć termičke energije iz plamena dovesti metalne katione u ekscitacijsko stanje. Kako su takva stanja nestabilna, ekscitirani ioni tu energiju emitiraju te se zabilježava njezin intenzitet i na temelju pikova određuje se koncentracija. Limit za željezo je 3 ppm, dok olova, arsena i bakra ne smije biti više od 0.1 ppm.

Novije metode uključuju induktivno sparnu plazma atomsku emisijsku spektrometriju (ICP AES) i voltometriju. Metale je, po novom, moguće odrediti i potenciometrijski, točnije derivacijskom potenciometrijskom *stripping* analizom, koja iziskuje puno kraće vrijeme analiziranja od voltometrije i spektroskopije (Boskou i sur. 2006).

α -tokoferol

Tokoferoli su spojevi čiji sadržaj uvelike ovisi o zrelosti ploda te varijacijama među različitim kultivarima. Raspon koncentracija iznosi 100-300 ppm, ovisno o kvaliteti. Međutim, tijekom prerade, koncentracija im drastično opada te se dodaju α -tokoferoli (vitamin E) za poboljšanje stabilnosti.



Slika 7. Struktura tokoferola. (<https://www.chemistry.ucla.edu/>)

Postoji nekoliko načina određivanja sadržaja, a najčešći je HPLC spregnuta s raznim detektorima. Oni uključuju amperometrijsku detekciju, UV-Vis i spektrofluorometrijsku. Faze u HPLC mogu biti i normalne i obrnute. Sadržaj se računa u usporedbi sa standardnim otopinama α -tokoferola određene koncentracije. Osim HPLC, može se koristiti i GC, ali samo uz trimetilsilil-derivatizaciju (Boskou i sur. 2006).

Vlaga i promjenjive tvari

Uzorak se zagrije na 105°C na pješčanoj kupki dok se vlaga i promjenjive tvari kompletno ne uklone. Mjeri se razlika u masama (Boskou i sur. 2006).

Onečišćenja netopljiva u organskim otapalima

Uzorak se izmiješa s petrolejem u suvišku, otopina se filtrira te se zagrije na 105°C. Mjeri se razlika u masama (Boskou i sur. 2006).

1.4 Određivanje sadržaja polifenola u maslinovom ulju

Osim osnovnih parametara obrađenih u prošlom poglavlju, postoje još neki pokazatelji kvalitete ulja koji nisu obavezni biti provjeravani prema standardima, ali njihovo određivanje daje ukupnu sliku o kakvoći ulja koje će potencijalno izići na tržište. Mjerenja se tiču uglavnom stupnja oksidacijskih procesa u uzorku: antioksidacijske aktivnosti, stupnja hidrolize, različitih potencijalnih kontaminanata te narušenih organoleptičkih svojstava koja proizlaze iz npr. mikrobiološke fermentacije. Vjerojatno najbitnije sporedno svojstvo ulja jest njegov sadržaj polifenola (Boskou i sur. 2006).

Kako bismo mogli kvantificirati polifenolne spojeve, potrebno ih je prvo izolirati iz ulja. Postoji nekoliko varijacija na temu, ali uglavnom se radi o vodeno-metanolnoj smjesi kao ekstrakcijskom mediju. Omjeri volumena su različiti, ali najefikasnijim se pokazao metanol:voda 80:20 v/v. Moguće je koristiti i apsolutni metanol, ali i tetrahidrofuran. Osim ekstrakcije u tekućem mediju, koriste se i čvrste faze. Nažalost, isključivo korištenje modificiranih C18 (oktildecil skupina, C₁₈H₃₇-) kolona kao stacionarnih faza, bez tekuće ekstrakcije, pokazalo je nezadovoljavajuću količinu izoliranih analita te se uglavnom te dvije metode provode zajedno. Osim C18 kolona, istražene su te se koriste i C8 (oktil skupina, C₈H₁₇-) te one od polivinilpirolidona (Boskou i sur. 2006).

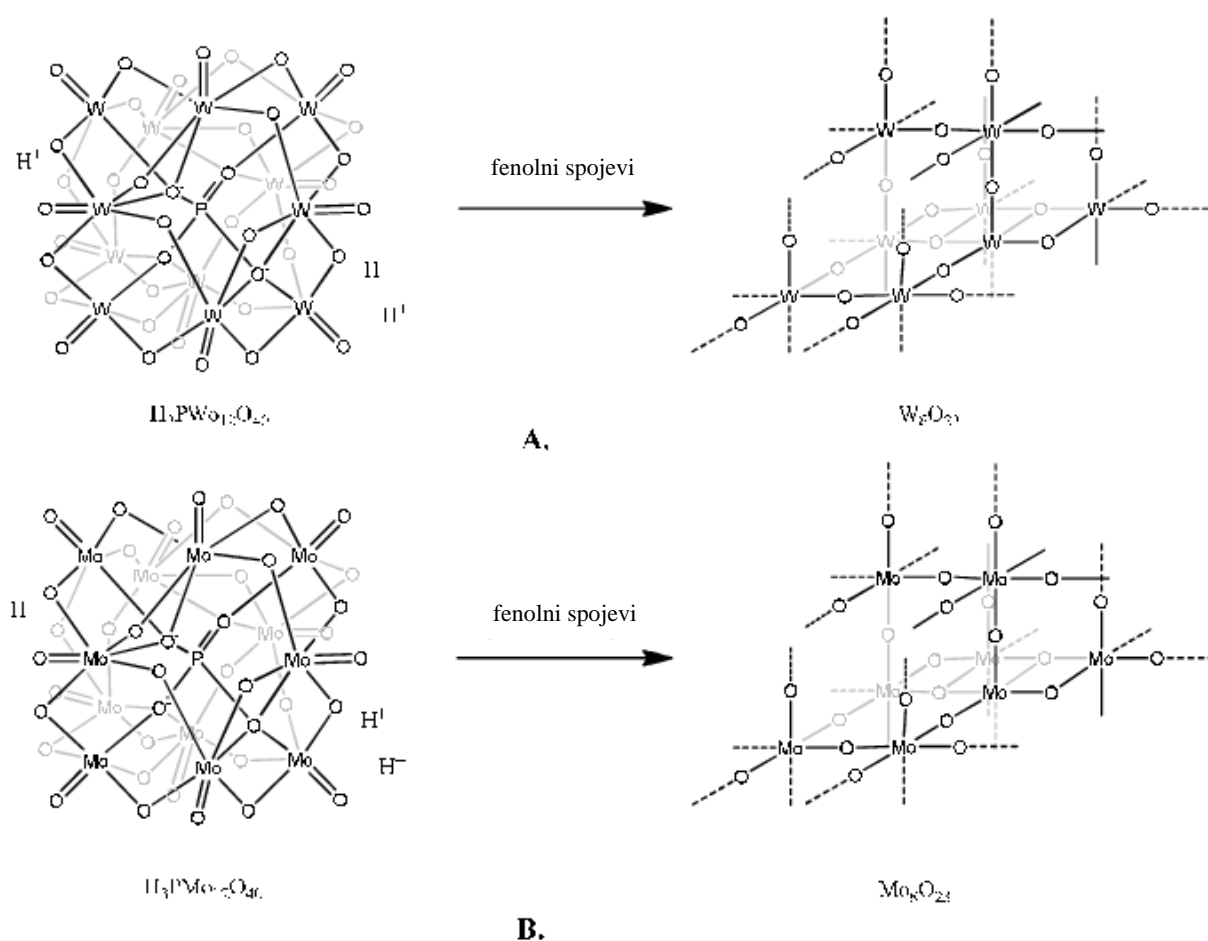
Određivanje ukupnog sadržaja polifenola u maslinovom ulju

Najčešći i najjednostavniji način određivanja ukupnog sadržaja polifenola u maslinovom ulju je uz pomoć Folin-Ciocalteuovog (FC) reagensa.

Početak prošlog stoljeća, švedsko-rumunjski znanstveni par Otto Folin i Vinila Ciocalteu osmislili su jednostavnu i brzu metodu određivanja antioksidacijskih spojeva. Glavni dio reagensa čini heteropolifosfovolframat-molibdat (dobiven iz natrijevih soli pojedinih sastavnica), dok je Li₂SO₄ tu kako bi uklonio bijeli precipitat koji se u njegovom odsustvu stvara te interferira s kolorimetrijskim rezultatima. Sami mehanizam djelovanja nije do kraja razjašnjen zbog izuzetno kompleksnih intermedijera koji nastaju. Ono što je poznato jest da ovaj sustav u kiselom mediju postoji kao hidratiziranioktaedarski kompleks sa fosforom u centru te stabiliziran metalnim oksidima. Volframov dio je bezbojan i teže se reducira, dok je molibdatna frakcija žuta i odgovorna za promjenu boje. Naime, redukcijom molibdatnog dijela iz MoO⁴⁺ (valencija Mo je +6) u MoO³⁺ (valencija Mo je +5) nastaje plava specija, dio većeg plavog kompleksa (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻. Omjer oksidiranog i reduciranog molibdena varira – može iznositi 0,6-9,0. Pri ispitivanju polifenolnih spojeva uloga polifenola je upravo da reducira molibdatnespecije te stvara već spomenute semikinonskedimere. Iz oksidiranog stanja fenoli se lančanim prijenosom elektrona mogu vratiti u reducirano stanje. Međutim, takav regeneriran fenol uglavnom će se ponovno oksidirati, i to brže nego prije. Stoga je bitno reakciju kvantifikacije završiti prije nego dođe do regeneracije kako ne bismo dobili nepouzdan rezultat. Važan je također i pH medija u kojem se nalaze ispitivani spojevi. Pri pH višem od pK (čija je vrijednost obično oko 10), oksidacija je brža i potpunija te se stoga, u svrhu ubrzanja metode, koristi pH lužnatog područja (Singleton i sur., 1999).

Apsorpcija se obično vrši pri 760 nm, ali ne nužno, jer stabilne plave specije imaju širok raspon valnih duljina pri kojima apsorbiraju (Singleton i sur., 1999).

Osim kod maslinovog ulja, FC reagens koristi se i pri određivanju fenolnim spojeva u vinima, spiritima, viskijima te sokovima bez pulpe. Potrebno je pripremiti, osim uzorka, slijepu probu. U slijepu probu umjesto metanolnog ekstrakta dodaje se standardna otopina poznate koncentracije. Najčešće je to galna kiselina, prvotno izolirana iz hrastovih šiški (lat. *gallae*), izraslina nastalih djelovanjem parazita poput osa, koje se nastane u njegovoj kori i tamo polože svoje ličinke. Drugi najkorišteniji standard je (+)-katehin, posebno koristan pri određivanju flavonoida (Singleton i sur., 1999).



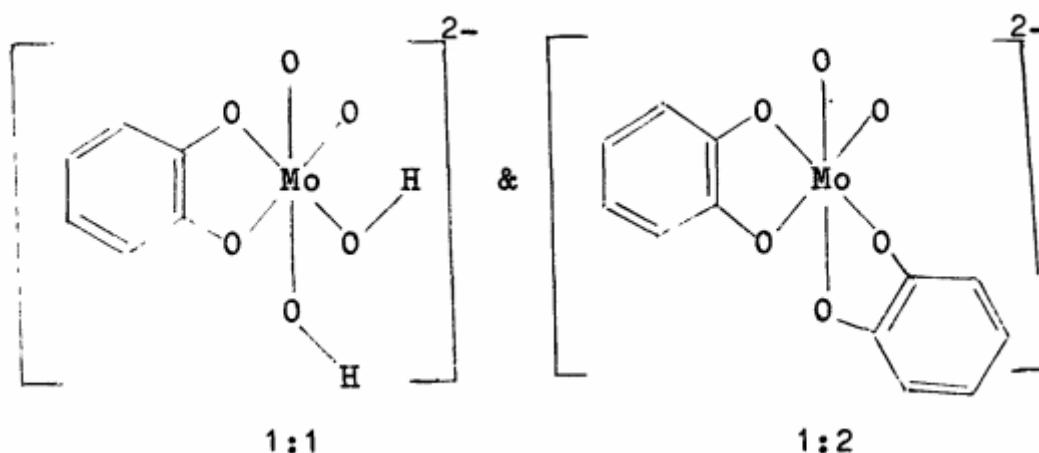
Slika 8. Specifična reakcija volframatnih i molibdatnihspecijaFolin-Ciocalteauovog reagensa s polifenolima. Reakcija A prikazuje promjenu u strukturi fosfovolframatne kiseline s polifenolima, dok u reakciji B reagiraju fosfomolibdatna kiselina i polifenoli (Bancuta i sur., 2016).

Mana ove metode njezina je neselektivnost prema fenolima – mogu ga reducirati i nefenolni spojevi. Zbog toga se predlaže da se više koristi u određivanju reducirajućeg kapaciteta, a manje u određivanju sadržaja (Alessandri i sur., 2014).

Određivanje o-difenola u maslinovom ulju

Jedna od skupina polifenola koja broji velik broj raznolikih spojeva su *o*-difenoli. U odnosu na jednu hidroksilnu skupinu druga se nalazi u orto položaju – jednostavnije rečeno, dvije OH-skupine vezane su za susjedne ugljikove atome na benzenovom prstenu. U praksi se njihova koncentracija ne određuje Folin-Ciocalteuovim reagensom zbog njegove nedovoljne selektivnosti prema ovoj konkretnoj grupi spojeva. Koristi se Na_2MoO_4 te se koncentracije određuje kolorimetrijski (Mateos i sur., 2001).

Različita istraživanja kompleksiranja molibdata s hidroksiliranimspecijama pokazala su njegov izuzetno velik afinitet prema difenolnim spojevima (kateholima), dikiselinama, mliječnoj kiselini, tartaratima i dr. U takvim kompleksima molibden ima 6 koordinativnih mjesta, a cijeli kompleks stabiliziran je vodikovim vezama. Pokazano je da se s galnom kiselinom veže u omjeru 2:3, dok s kateholom tvori 2 kompleksa.



Slika 9. Dva najčešća kompleksa molibdata s kateholima. Monokompleksiranaspecija ima veću konstantu disocijacije zbog dviju slobodnih kiselih hidroksilnih skupina koje od metalnog iona odbijaju ostale ligande. (<https://shodhganga.inflibnet.ac.in/>)

Koncentracija takvih spojeva određuje se spektrofotometrijski. U vodeno-metanolnom mediju (1:1) otopi se uzorak ulja, doda se 4 puta manji volumen Na-molibdata. Smjesa se ostavi na 15 minuta u mraku te joj se mjeri apsorbancija na 317 nm. Kao slijepi uzorak koristi se otopina fenola s vodeno-metanolnim medijem umjesto Na-molibdata te se također ostavi na 15 minuta u mraku, potom se mjeri apsorbancija na 317 nm (Mateos i sur., 2001).

Određivanje polifenola u maslinovom ulju metodom HPLC

Za razliku od FC reagensa, HPLC metoda određivanja većine analita, pa tako i polifenola, specifičnija je i osjetljivija. Nažalost, aparatura je skuplja, a vremenski iziskuje puno više (Alessandri i sur., 2014).

HPLC, *highperformanceliquidchromatography*, složen je oblik tekućinskekromatografije. Zajedničko svim kromatografskim tehnikama je postojanje mobilne i stacionarne faze. Mobilna faza pod djelovanjem neke sile (gravitacijske ili kapilarne) nosi analite kroz stacionarnu fazu, a ovisno o (ne)polarnosti različita su vremena zadržavanja na stacionarnoj fazi te se tako i razdvajaju. Najjednostavniji način razdvajanja jest izokratičnomeluacijom, odnosno onom kod koje je sastav mobilne faze isti. Međutim, puno je praktičniji gradijentni sastav, uobičajen za HPLC, kod kojeg se sadržaj mobilne faze mijenja, bilo skokovito bilo kontinuirano. Na taj se način pospješuje djelotvornost elucije (Skoog i sur., 1999).

Sustav za HPLC sastoji se od spremnika mobilne faze, crpke, sustava za uvođenje uzorka, kolone za tekućinskukromatografiju i detektora.

Spremnik mobilne faze, odnosno otapala najčešće je napravljen od čelika ili stakla, a u sebi često sadrži i opremu za otplinjavanje kako mjehurići zraka ne bi ometali detekciju. Nepotrebni se plinovi odstranjuju pomoću mjehurića inertnog plina netopljivog u mobilnoj fazi, primjerice helija.

Crpke koje zadovoljavaju uvjete za korištenje u HPLC ispunjavaju iduće kriterije:

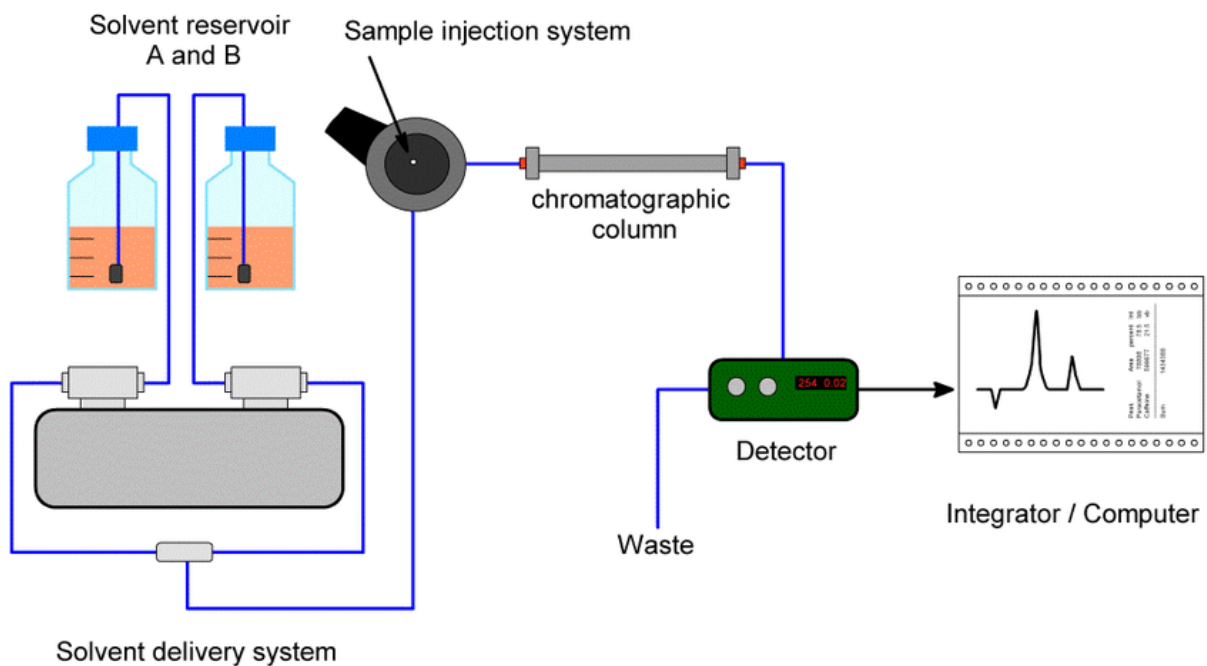
- izdrže tlak do 40 milijuna Pa
- omogućavaju brzinu protoka u rasponu 0,1-10 mL/min
- reproducibilnost protoka > 99.5%
- otpornost na koroziju
- izlaz uzorka bez pulsiranja zraka

U upotrebi su dvije najčešće vrste: one s vijačnim pogonom i recipročne, koje se češće koriste zbog previše nedostataka ovih prvih. Bitna karakteristika recipročnih crpki je mogućnost primjene gradijentne elucije, što kod crpki na vijačni pogon nije moguće. Postoje još i pneumatičke, ali one se ne nalaze u svim uređajima.

Sustav za unošenje uzorka također dolazi u više varijanti. Jednostavniji, ali i nepouzdaniji način jest onaj koji prodire kroz septum na početku kolone, dok je modernija tehnologija razvila uređaje uz zaustavljanje protoka, sastavljene od plinskog ventila kroz koji se injekcijskom štrcaljkom na punilo unosi uzorak. Standardni dio ventila je i petlja koja regulira volumen unošenja.

Same kolone izvana su izgrađene od čeličnih ili staklenih cijevi dugačkih 10-30 cm, unutrašnjeg promjera 4-10 mm. Iznutra je punilo čije veličine pora i sastav ovise o vrsti tekućinskekromatografije. Konkretno za određivanje polifenola koristi se razdjelna tekućinskakromatografija. Osnovni dio svakog punila je silikagel, a ovisno o prirodi ispitivanih spojeva (kiseli, bazični, hidrofilni, hidrofobni, zwitter-ioni...) on se derivatizira odgovarajućim spojevima. Kao što je spomenuto, polifenoli se kvantificiraju uz pomoć C8 ili C18 kolona, dakle silikagelom obloženim lipofilnim lancima. Takve su kolone dio kromatografije obrnutih faza kod kojih je stacionarna faza hidrofobna, a mobilnu čini smjesa polarnih otapala (voda, metanol, acetonitril). Kod kolona normalnih faza polarnost stacionarne i mobilne faze je obrnuta te se rjeđe koristi, ali se iz povijesnih razloga zove normalnom – prva je otkrivena.

Nakon elucije, analite je, u slučaju određivanja koncentracije, potrebno nekako detektirati. Najčešći detektori temelje se na apsorpciji svjetlosti u ultraljubičastom i vidljivom području. Poprilično frekventni su fotometri sa živinom žaruljom kao izvorom svjetlosti sa spektralnim linijama na 254 i 280 nm jer pri tim valnim duljinama većina organskih spojeva apsorbira svjetlost. Volframovi i deuterijski izvori također su u upotrebi. Osim fotometrijskih metoda, moguće je mjeriti i indeks loma svjetlosti mobilne faze prije i poslije elucijeanalita te dovesti u proporciju s njegovom koncentracijom. Međutim, ova je metoda nedovoljno selektivna jer uzima promjenu indeksa sa svim sastavnicama, a ne samo onom koja se ispituje (Skoog i sur., 1999).



Slika 10. Shematski prikaz HPLC sustava (Scherf-Clavel, 2016.).

Moderni laboratoriji sve češće koriste spregnutu metodu HPLC-DAD-MS, odnosno HPLC-*diode arraydetection-massspectrometry*. Poslije izlaska iz kolone, uzorku se mjeri apsorbanacija, A . Osnovno načelo DAD metode je mjerenje intenziteta apsorpcije elektromagnetnog zračenja u vidljivom (350-850 nm), odnosno ultraljubičastom (200-350 nm) spektralnom području. Kroz uzorak se pusti svjetlost intenziteta I_0 . Energija te svjetlosti prevede elektrone u vanjskoj ljusci atomskih orbitala u pobuđeno stanje. Dio svjetlosti ostane apsorbirano, a dio se emitira vraćanjem u osnovno stanje, što emitira svjetlost intenziteta I . ApSORBANCija, veličina koja se mjeri, izražava se kao:

$$A = \log_{10} I_0/I$$

Prema pretpostavci Beer-Lambertovog zakona, količina apsorbirane svjetlosti proporcionalna je koncentraciji uzorka u kivetu:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A – apsorbanacija, ε – molarni apsorpcijski koeficijent, c – koncentracija tvari, l – duljina kivete

Metoda se koristi za određivanje čistoće i identiteta uzorka jer svaka tvar apsorbuje na sebi svojstvenoj λ . Međutim, s obzirom da više tvari može apsorbuirati na sličnoj valnoj duljini zbog slične strukture, nije dovoljno selektivna. (<http://www.rsc.org/>)

Kako bi se dodatno potvrdio identitet, uzorak se podvrgne masenoj spektroskopiji, najčešće *electrospray* ionizaciji. U tom se procesu pod visokim naponom uz N_2 tekući uzorak prevodi u aerosol (Fernandez De La Mora, 2007). Tijekom djelovanja napona, otapalo isparava, a na uzorak se vežu ioni porijeklom iz otapala. Radi destabilizacije strukture novonastalim nabojem, spoj se fragmentira te ti fragmenti ulaze u magnetno polje u kojem se rotiraju. Zbog različitih masa i naboja fragmenata, oni se „zalijeću“ na različita mjesta u detektoru koji njihove lokacije prevodi u elektronski zapis. Svaki spoj ima svoj *fingerprint* maseni spektrogram te je ova metoda jedna od najpouzdanijih pri identifikaciji.

Promjene apsorbanacije, odnosno indeksa loma, same po sebi ne znače ništa jer se nemaju s čime usporediti. Postoje tri metode pomoću kojih se ipak može doći do koncentracije: metoda sa standardom, metoda baždarnog pravca i metoda unutarnjeg standarda.

Kod metoda sa standardom analitički parametri odnose se na veličine pika. Mjeri se ili njegova visina ili površina. Nekoć su se mjerili ručno, danas digitalnim putem zbog manjih pogrešaka. Visina pika jest duljina okomice povučene iz njegovog vrha do njegove baze. Na nju utječu brojni čimbenici, poput brzine protoka, temperature te brzine injektiranja samog uzorka. Zato je zahvalnije mjeriti površinu, na koju nijedan od navedenih čimbenika ne utječe. Koji god se parametar određivao, visina ili površina, uspoređuje se s pikom standardne otopine.

Standardna otopina je otopina analita istog entiteta kao onaj kojeg se ispituje u poznatoj koncentraciji te se iz omjera površina njezinog pika s uzorkovim izračuna koncentracija po formuli:

$$\frac{A_{io}}{A_{so}} = \frac{c_{io}}{c_{so}}$$

A_{io} – apsorbancija ispitivane otopine; A_{so} – apsorbancija standardne otopine; c_{io} – koncentracija ispitivane otopine; c_{so} – koncentracija standardne otopine

Metoda baždarnog pravca uključuje, kako i ime nalaže, izradu pravca ovisnosti promjene veličine koju mjerimo o koncentraciji analita. Prvo se izrade otopine standarda poznatih koncentracija (obično rastu poput aritmetičkog niza) te im se mjeri to određeno svojstvo. Nakon unošenja točaka na graf, pravac se provuče kroz točke. Cilj je postići što veću preciznost, iako to često nije slučaj. Nakon crtanja grafa s ishodištem u (0, 0), ispitivanom se uzorku također izmjeri promjena apsorbancije/loma svjetlosti te se iz jednadžbe nacrtanog pravca izračuna koncentracija. Metoda je brza, jednostavna, ali i nepouzdana zbog nerijetkih oscilacija volumena pri injektiranju volumena standardnih otopina u kolonu. Volumeni su mikrolitarski i može se dobiti pogreška i do nekoliko % (Skoog i sur., 1999).

Metoda unutrašnjeg standarda postiže najveću preciznost koja se gubi, na primjer, kod metode standardnih otopina gdje se vrlo lako mogu razlikovati volumeni uzoraka standardne i otopine za ispitivanje. U obje otopine doda se pažljivo izvagan unutrašnji standard, najčešće spoj strukturno sličan ispitivanom. Analitički parametar je omjer površine/visine pika unutaršnjeg standarda s ispitivanim analizom. Da bi metoda bila valjana, pik unutrašnjeg standarda mora biti odijeljen s razlučivanjem $R_s > 1,25$ od ostalih sastavnica te biti u blizini analita. Preciznost ove metode, ukoliko je unutrašnji standard pogodan, može biti 0,5-1% (Skoog i sur., 1999).

IOC (International Olive Council) predlaže da se ukupni polifenoli računaju metodom unutrašnjeg standarda. Kao unutarnji standard koristi se *syringic* kiselina, a kao vanjski tirozol. Stacionarnu fazu čini C18 kolona, dok je mobilna smjesa metanola, vode i acetonitrila. Elucija je gradijentna.

Tablica 3. Omjer vode/metanola/acetonitrila u gradijentnoj eluciji maslinovog ulja u svrhu kvantificiranja fenolnih spojeva.

vrijeme/min	brzina protjecanja / mL/min	% vodene otopine 0,2% H ₃ PO ₄	% metanola	% acetonitrila
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

Prije elucije uzorka pusti se da kroz kolonu isteče otopina metanol/voda. Zatim se injektira 20 µL vanjskog i unutrašnjeg standarda te se snimi kromatogram pri 280 nm. Odrede se RF, faktor odaziva, za tirozol i syringic kiselinu.

$$RF_{1\mu\text{g}}(\text{syringickiselina}) = A(\text{syringickiselina}) / \mu\text{g injektirane syringickiselina}$$

$$RF_{1\mu\text{g}}(\text{tirozol}) = A(\text{tirozol}) / \mu\text{g injektiranog tirozola}$$

$A(\text{syringic kiseline})$ i $A(\text{tirozol})$ označavaju površine pikova na kromatogramu pri apsorpciji od 280 nm.

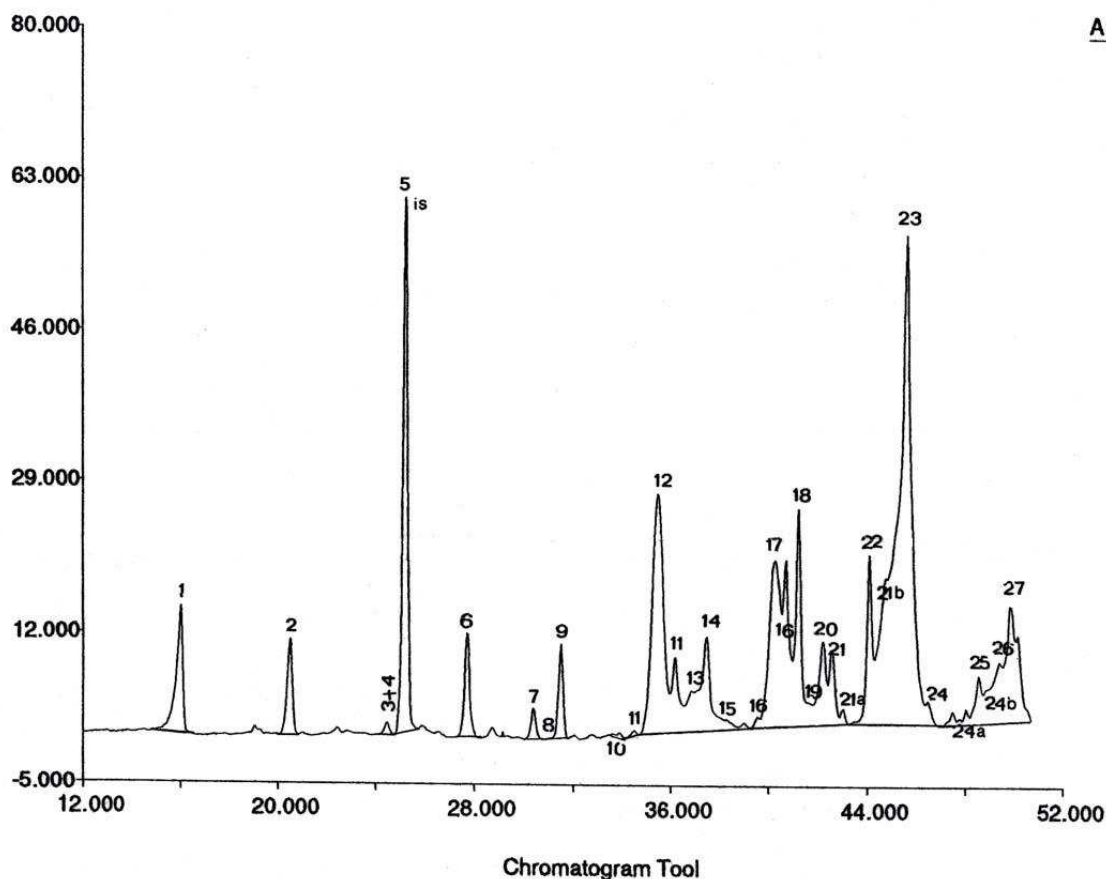
Zatim se izračuna omjer faktora odaziva, RRF, prema formuli:

$$RRF = \frac{RF_{1\mu\text{g}}(\text{syringic acid})}{RF_{1\mu\text{g}}(\text{tirozol})}$$

Konačno, u kolonu se injektira 20 µL uzorka te se snimi kromatogram na istoj valnoj duljini. Mjerenje se ponovi dvaput. Zbroje se površine svih pikova u oba kromatograma, ΣA , te uvrste u formulu za izračunavanje ukupnog sadržaja. Sadržaj se izražava u mg tirozola po kilogramu uzorka.

$$(\text{mg/kg}) = \frac{\Sigma A \cdot 1000 \cdot RRF \cdot W_{\text{syr. kiseline}}}{A(\text{syr.kiseline}) \cdot W}$$

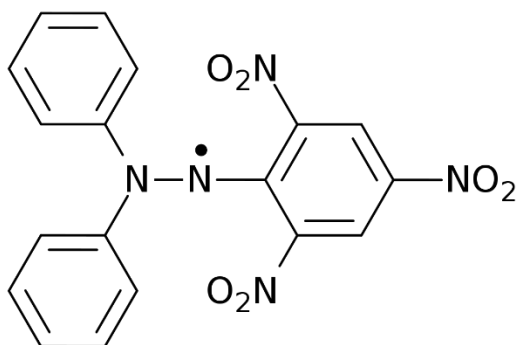
m u ovom slučaju označava masu ispitivanog uzorka izraženu u gramima, $m_{\text{syr.kiseline}}$ masu izvaganog unutrašnjeg standarda u mg, 1000 je faktor pomoću kojeg se rezultat izražava u mg/kg (IOOC, 2009).



Slika 11. Primjer prikaza kromatograma dobivenog provlačenjem uzorka maslinovog ulja kroz HPLC kolonu. Zbroj površina svih pikova daje ukupnu količinu polifenolnih spojeva (IOOC, 2009.).

1.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti polifenola iz maslinova ulja s DPPH

O važnosti sprečavanja oksidacije komponenata ulja, prvenstveno polinezasićenih masnih kiselina već je bilo riječi. Jedna od metoda kojom se može kvantificirati antioksidacijska aktivnost polifenola maslinova ulja je uz pomoć DPPH metode. DPPH, odnosno 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, reagens je koji oksidacijom stvara stabilne radikale.



Slika 12. DPPH radikal (<https://www.chemistry.ucla.edu/>).

U metanolnu otopinu ulja doda se otopina određene koncentracije DPPH radikala, najčešće $6-10 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, DPPH•, te se mjeri apsorbancija na 515 nm, valnoj duljini na kojoj je apsorbancijski maksimum radikala. S obzirom da reducirani oblik ne apsorbira na toj λ , očekujemo pad apsorbancije.



AH u ovom slučaju označava reducirani oblik antioksidansa (Brand-Williams i sur, 1995).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Još od antičkog doba, maslinovo se ulje koristi kao bitan dodatak svakoj prehrani, pogotovo mediteranskoj, zbog njegovog povoljnog utjecaja na zdravlje. S obzirom na sve veći trend promocije ulja ove sredozemne biljke kao *must-have* u gotovo svakom objedu, predmet je sve većeg brojnanstvenih istraživanja. Utvrđeni su brojni učinci na zdravlje – prevencija tumorigeneze, usporenje progresije neurodegenerativnih bolesti, smanjenje LDL-a te povećanje HDL-a, čime se prevenira nastanak arterosklerotskih plakova te protuupalno djelovanje (Rigacci i sur., 2016). Iscrpnim istraživanjima utvrđeno je da se veliki dio pozitivnih učinaka pripisuje polifenolnim spojevima kojih je u maslinovom ulju napretek. Neki od njih (tirozol i hidroksitirzol) nisu svojstveni samo maslinama, dok drugi, poput oleuropeina, oleokantala te oleacina jesu (Lozano-Castellon i sur., 2019). Interakcijom preko brojnih receptora, kontroliranjem signalnih puteva i kaskadnih reakcija, djelovanjem na stanični ciklus, kanale, enzime, sintezu proteina ili jednostavno sudjelovanjem u redoks reakcijama postižu se svi navedeni efekti.

Postoji veći broj pravilnika koji propisuju određene smjernice koje određuju kvalitetu i kategoriju maslinovog ulja. Najvažniji su IOC, Codex Alimentarius i EC. Jedna od glavnih odrednica kvalitete, ali i starosti ulja jest sadržaj slobodnih masnih kiselina (Boskou i sur., 2006). Osim ovih, po svim standardima propisanih smjernica, jedno od najčešćih ispitivanja jest određivanje količine polifenolnih spojeva u ulju. Postupci njihovog određivanja uobičajeno se temelje upravo na njihovim antioksidacijskim, odnosno reduktivnim svojstvima. Ukupni se fenoli određuju uz pomoć Folin-Ciocalteuovog reagensa (Singleton i sur., 1999), dok se *o*-difenoli određuju reakcijom s Na-molibdatom. Vrlo često se antioksidacijska aktivnost procjenjuje antioksidacijskim testom s DPPH radikalom (Brand-Williams i sur., 1995).

Cilj diplomskog rada je ispitati kvalitetu maslinovog ulja s obzirom na sadržaj polifenolnih spojeva. Najprije je potrebno odrediti pripada li uopće uzorak maslinovog ulja u kategoriju ekstra djevičanskog maslinovog ulja. U tu će se svrhu odrediti sadržaj slobodnih masnih kiselina. Nadalje, uz primjenu uobičajenih metoda odredit će se sadržaj ukupnih fenola, *o*-difenola te antioksidacijska aktivnost fenolnog ekstrakta. U tu će se svrhu izraditi odgovarajući baždarni pravci. Rezultati analize doprinjet će prepoznavanju maslinovog ulja kao vrijednog izvora biološki aktivnih fenolnih spojeva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Kemikalije, instrumenti i laboratorijski pribor

U eksperimentalnom dijelu korištene su sljedeće kemikalije:

- redestilirana voda
- 0,05 mol dm⁻³ NaOH
- 1 mol dm⁻³ HCl – titrival, Merick
- otopina fenolftalein indikatora
- etanol 96%
- metanol za HPLC
- Folin-Ciocalteuov reagens (Fluka)
- Na₂CO₃, *p.a.* (Kemika)
- Na₂MoO₄, *p.a.* (Kemika)
- galna kiselina, *p.a.* (Sigma, Aldrich)
- DPPH, *p.a.* (Sigma, Aldrich)

Korišteni su sljedeći instrumenti i pribor:

- vaga Mettler H2OT (Pmax= 160 g, d = 0,01 mg)
- UV-Vis spektrofotometar S2000 Ocean Optics Inc. s izvorom zračenja Top Sensor Systems DH-2000-Avasoft 8.4. računalni program za obradu spektralnih podataka
- magnetna miješalica
- Eppendorf automatske pipete od 10, 20, 100, 200 i 1000 µL s odgovarajućim plastičnim nastavcima za jednokratnu upotrebu
- staklene odmjerne tikvice od 5, 10, 50 i 250 mL
- staklene čaše od 100 mL
- staklene Erlenmayerove tikvice s ubrušenim čepom
- kvarcne kivete QS 10,0 mm Helma
- bireta

3.2 Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina u maslinovom ulju

Sadržaj slobodnih masnih kiselina određen je titracijom s jakom lužinom, NaOH. Prije titracije ulje se pomiješa s blago zagrijanim 96%-tnim etanolom, kojemu se neposredno prije

dotatka ulju pažljivo neutraliziraju tragovi kiselina dodatkom NaOH. Kao indikator koristi se fenolftalein, koji u točki ekvivalencije prelazi iz bezbojne u ružičastu boju.

Reakcija neutralizacije slijedi jednadžbu:



Standardizacija otopine NaOH

U staklenu čašu od 100 mL stavi se 2 mL vode, doda se 0,200 mL standardne 1 mol dm^{-3} otopine HCl te par kapi fenolftaleina. Otopina se titrira s približno $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopinom NaOH, čija se koncentracija određuje.

Reakcija neutralizacije:



Mjerenje se ponavlja tri puta te se iz utrošenih volumena dobije koncentracija na sljedeći način:

$$\begin{aligned} n(\text{NaOH}) &= n(\text{HCl}) \\ c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH}) &= c(\text{HCl}) \cdot V(\text{HCl}) \\ c(\text{NaOH}) &= \frac{c(\text{HCl}) \cdot V(\text{HCl})}{V(\text{NaOH})} \end{aligned}$$

Rezultat se prikazuje kao srednja vrijednost svih valjanih mjerenja.

Priprema 96%-tnog etanola za neutralizaciju

Ulije se 25 mL 96%-tnog etanola u staklenu čašu, doda se kap fenolftaleina te otprilike 200 μL NaOH približne koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ do pojave svijetloružičaste boje. Nakon neutralizacije, etanol se blago zagrije.

Titracija uzorka maslinovog ulja

Odvaži se $10 (\pm 0,01)$ g ulja i doda prethodno ugrijani etanol s par kapi fenolftaleina. Kao titrant koristi se standardizirana otopina NaOH. Tijekom cijele titracije smjesa se miješa na magnetnoj miješalici.

Slobodne masne kiseline (*free fatty acids*, FFA) izražavaju se kao oleinska kiselina na sljedeći način:

$$\begin{aligned} \% \text{ FFA} &= \frac{m(\text{oleinske kiseline})}{m(\text{uzorka})} \cdot 100\% \\ m(\text{oleinske kiseline}) &= n(\text{oleinske kiseline}) \cdot M_r(\text{oleinske kiseline}) \\ n(\text{oleinske kiseline}) &= n(\text{NaOH}) = c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH}) \\ M_r(\text{oleinske kiseline}) &= 282 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

$$\% \text{ FFA} = V(\text{NaOH}) - c(\text{NaOH}) - 0,282 - 100\% / \text{g uzorka}$$

3.3 Određivanje ukupnih fenola u maslinovom ulju

Ukupni fenoli određivani su spektrofotometrijskom metodom sFolin-Ciocalteuovim reagensom.

Baždarni pravac

Pripremi se osnovna otopina galne kiseline koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otapanjem odvagane krutine u metanolu u odmjerne tikvici (otopina A). Razrjeđivanjem ove otopine pripreve se dva niza po sedam otopina galne kiseline koncentracija u rasponu od $0,001$ do $0,006 \text{ mol dm}^{-3}$ (otopine B1-B7). Pripravi se 250 mL 20% -tne otopine Na_2CO_3 , otapanjem odvagane krutine u vodi.

Potom se također u tikvici od 10 mL pripremi otopina kojoj će se mjeriti apsorbancija. Otpipetira se 5 mL destilirane vode, doda $0,100 \text{ mL}$ metanolne otopine galne kiseline (otopine B1-B7) te $0,25 \text{ mL}$ FC reagensa. Miješa se 3 minute, a može se opaziti i promjena boje u zelenu. Potom se smjesi doda $1,5 \text{ mL}$ 20% -tnog Na_2CO_3 , nadopuni destiliranom vodom do marke te ostavi stajati u mraku 1 h . Naposljetku se otopinama mjeri apsorbancija na 725 nm . Dobiveni podaci koriste se za izradu baždarnog pravca koji će se koristiti za određivanje koncentracije ukupnih fenola.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola u uzorku maslinovog ulja

Identičan postupak kao kod izrade baždarnog pravca provodi se i za određivanje koncentracije ukupnih fenola u uzorku maslinovog ulja, osim što se u tom slučaju ne pipetira otopina standarda već metanolne otopine ekstrakta maslinovog ulja.

Fenolni spojevi su ekstrahirani iz maslinovog ulja na sljedeći način: uzorak maslinovog ulja mase 20 g miješa se magnetnom miješalicom s 4 mL metanola tijekom 30 minuta. Metanolni se sloj odvoji centrifugiranjem pri 5000 okretaja/min tijekom 30 minuta. Postupak se ponovi dvaput. Zatim se ekstrakti upare pri sniženom tlaku i uz prisustvo N_2 pri 32°C . Ostaci se suspendiraju u 5 mL acetonitrila, a lipofilne komponente se izmučivanjem s 10 mL heksana uklone. Acetonitril se potom upari dušikovim parama. Suhi ekstrakt se pohrani na -20°C te se

tek neposredno pred analizu izvadi i pomiješa s 2 mL metanola (korišten je metanolni ekstrakt iz laboratorija) (Jakobušić Brala i sur., 2015).

Na temelju izmjerene apsorbancije, iz jednadžbe baždarnog pravca odredi se koncentracija ukupnih fenola u ispitivanom metanolnom ekstraktu, iz koje se onda prečuna koncentracija ukupnih fenola u maslinovom ulju, uzimajući u obzir masu uzorka ulja iz kojeg su ekstrahirani fenolni spojevi i volumen metanola u kojemu je otopljen suhi ekstrakt.

3.4 Određivanje *o*-difenola u maslinovom ulju

Baždarni pravac

Za potrebe određivanja koncentracije *o*-difenola u uzorku pomoću Na-molibdata potrebno je izraditi baždarni pravac.

Pripremi se otapalo voda: metanol=1:1 v/v, koje će se koristiti tijekom mjerenja. Pripremi se 5 mL 5%-tne otopine Na₂MoO₄ reagensa i 5 mL otopine galne kiseline koncentracije 0,1 mol dm⁻³ otapanjem krutina u metanolu. Iz osnovne otopine galne kiseline razrjeđivanjem se pripravi niz otopina galne kiseline u rasponu koncentracija 0,0005-0,008 M (otopine A1-A9).

Otopine B1-B9 izrađuju se u odmjernim tikvicama od 5 mL, tako što se otopine A razrijede deset puta u otapalu voda:metanol=1:1 v/v. Otopine B se koriste se za pripremu otopina u kivetima; usporedno se pripremaju otopine u dvije kivete, u jednoj će biti slijepa proba (otopina galne kiseline bez dodatka Na₂MoO₄), a u drugoj uzorak (otopina galne kiseline uz dodatak Na₂MoO₄). Naizmjenično se mjere apsorbancije slijepih proba i uzoraka. U slijepu probu otpipetirana su 2 mL otopina B1-B9 te 0,5 mL otapala voda:metanol=1:1 v/v. U uzorak se umjesto otapala pipetira 0,5 mL Na₂MoO₄. I uzorak i slijepa proba dobro se promiješaju, ostave u mraku 15 minuta te im se izmjeri apsorbancija na 370 nm. Dobiveni rezultati koriste se za izradu baždarnog pravca, koji se koristi za određivanje *o*-difenola u maslinovom ulju.

Određivanje sadržaja o-difenola u uzorku maslinovog ulja

Identičan postupak kao kod izrade baždarnog pravca provodi se i za određivanje koncentracije *o*-difenola u uzorku maslinovog ulja, osim što se u tom slučaju ne pipetira otopina standarda već metanolne otopine ekstrakta maslinovog ulja.

U odmjernim tikvicama od 5 mL napravi se razrijeđeni osnovni metanolni ekstrakt, EXTR, miješanjem 5 mL otapala voda:metanol=1:1 v/v s 0,5 mL ekstrakta. Zatim se u prvoj kivetima 2 mL EXTR pomiješa s 0,5 mL otapala voda:metanol=1:1 v/v., te 2 mL EXTR otopine s 0,5 mL

Na₂MoO₄ za ispitivanje uzorka. Sadržaj obiju kiveta dobro se promiješa, ostavi u mraku na 15 minuta te im se izmjeri apsorbancija na 370 nm.

3.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti fenolnog ekstrakta maslinovog ulja DPPH metodom

Pripremi se osnovna otopina DPPH, koncentracije 0,002 mol dm⁻³ otapanjem odvagane krutine u metanolu. Zatim se izradi otopina A - 10⁻⁴ mol dm⁻³ otopina DPPH u odmjernoj tikvici od 25 mL. S DPPH mora se raditi pažljivo jer djeluje nagrizajuće na odjeću i kožu. Otopina se čuva na hladnom i u mraku.

Test antioksidacijske aktivnosti provodi se u kivetama. U prvu kivetu namijenjenu slijepoj probi otpipetira se 2,9 mL otopine A i 0,1 mL metanola. Druga kiveta sadrži 2,9 mL otopine A i 0,1 mL metanolnog ekstrakta maslinovog ulja. Objema se apsorbancija mjeri na 517 nm, i to neposredno nakon miješanja DPPH i uzorka ili metanola (0. minuta) te nakon 20 i 30 min. Za vrijeme čekanja kivete se drže u mraku kako ne bi došlo do fotoosjetljivih reakcija koje bi mogle interferirati s rezultatima. Ukoliko se apsorbancije nakon 20 i 30 min razlikuju, prati se njezina promjena svakih 10 min dok se ne ustali. Otopina DPPH s polifenolima isprva je ljubičasta, zatim s vremenom prelazi u žutu.

$$\%(\text{antioksidacijske aktivnosti}) = \frac{A(\text{slijepa probe}) - A(\text{uzorka})}{A(\text{slijepa probe})}$$

% (antioksidacijske aktivnosti) – udio potrošenog DPPH; A (slijepa probe) – apsorbancija 10⁻⁴ mol dm⁻³ otopine DPPH s dodatkom metanola; A (uzorka) – apsorbancija 10⁻⁴ mol dm⁻³ otopine DPPH s dodatkom fenolnog ekstrakta maslinovog ulja

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Rezultati

Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina

Tablica 4. Volumen utrošenog NaOH za neutralizaciju HCltrivala, 1 mol dm⁻³.

V(HCL 1 mol dm ⁻³)/mL	V(NaOH)/mL	c(NaOH)/mol dm ⁻³	c(NaOH)/mol dm ⁻³	σ	E_r
0,200	2,75	0,0727	0,0721	0,0009	1,27%
0,200	2,80	0,0714			

Koncentracija standardizirane otopine NaOH iznosi **0.0721 (±0,0009) mol dm⁻³**.

Tablica 5. Volumeni utrošene standardizirane otopine NaOH za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina u uzorku maslinovog ulja.

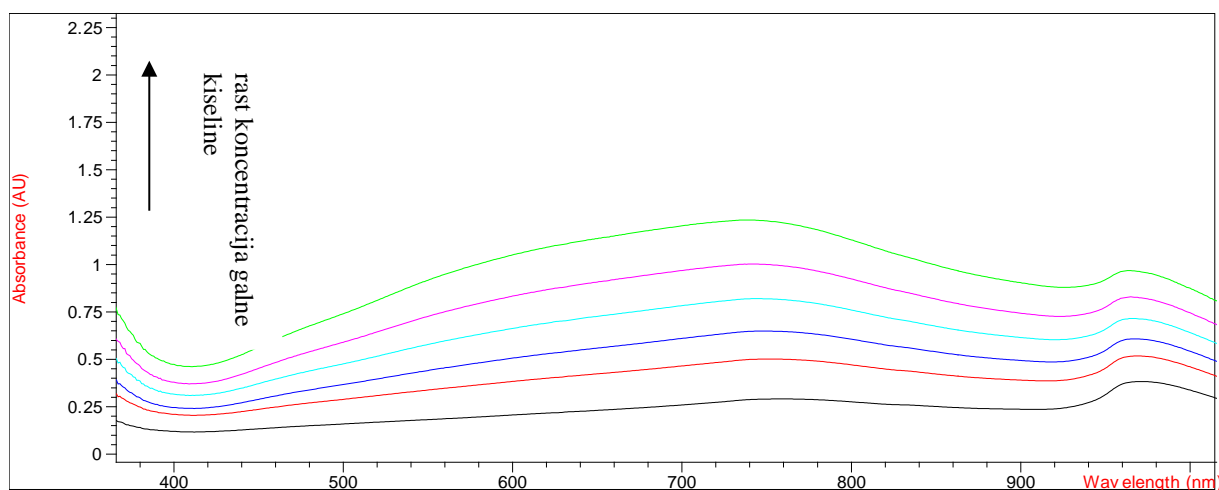
uzorak	m(ulja)/g	V(NaOH 0,0721 mol dm ⁻³)/mL	% slobodnih masnih kiselina	% slobodnih masnih kiselina	σ	E_r
1	10,33	1,50	0,295	0,302	0,006	1,92%
	9,98	1,50	0,306			
	10,00	1,50	0,305			
2	10,22	1,00	0,199	0,195	0,004	1,96%
	10,02	0,95	0,193			
	10,06	0,95	0,192			
3	10,16	1,00	0,200	0,190	0,010	5,00%
	10,16	0,95	0,190			
	10,16	0,90	0,180			

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da sva tri uzorka pripadaju kategoriji **ekstra djevičanskih maslinovih ulja**, zadovoljavajući limit prema važećim propisima da **sadržaj slobodnih masnih kiselina ne prelazi 0,8%**.

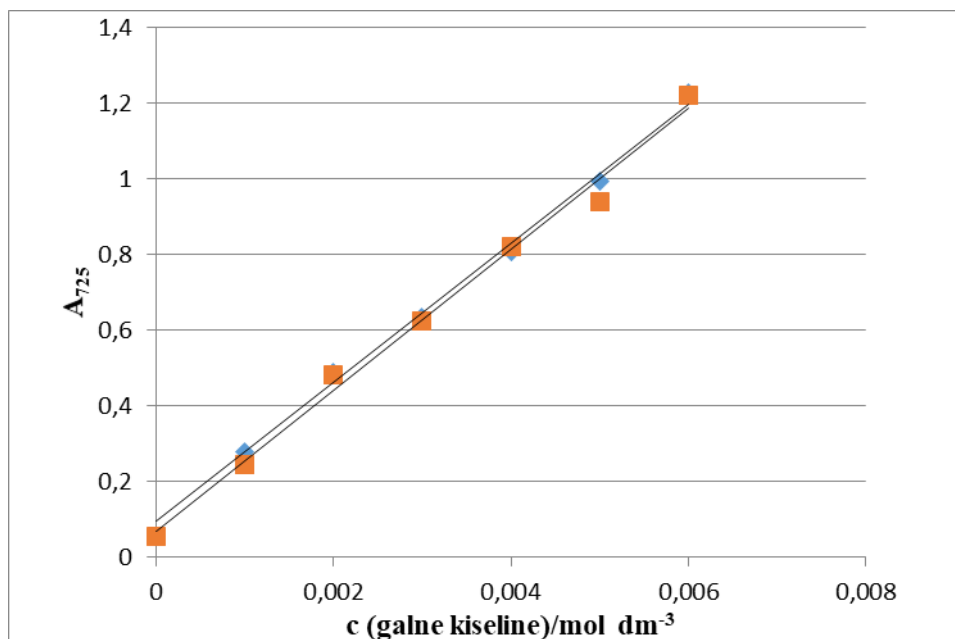
Određivanje ukupnih fenola

Tablica 6. Podaci za izradu baždarnih pravaca za određivanje ukupnih polifenola u uzorku maslinovog ulja s Folin-Ciocalteuovim reagensom.

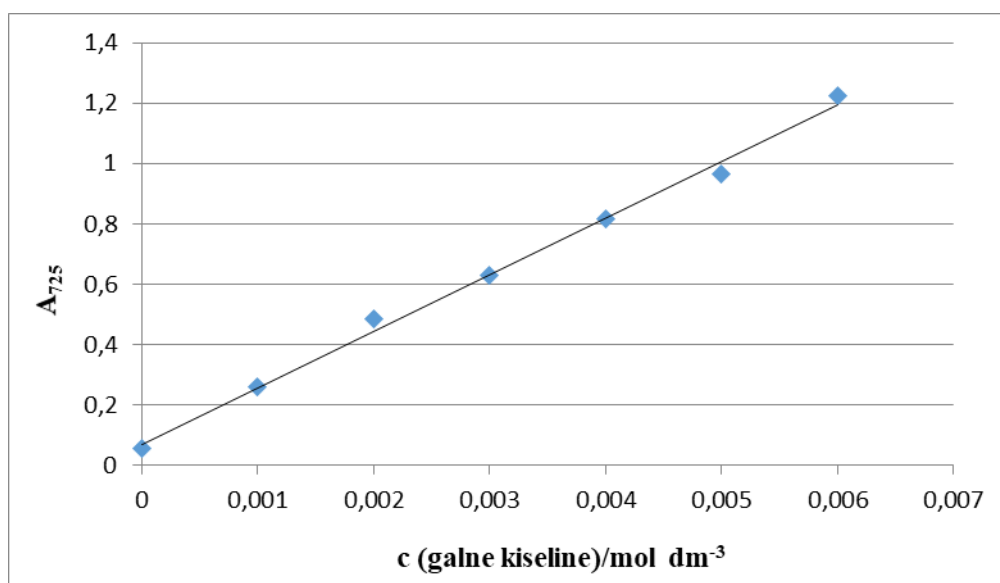
	baždarni pravac 1	baždarni pravac 2			
c (galne kiseline)/mol dm^{-3}	A_{725}		\bar{A}_{725}	σ	E_r
0,001	0,2768	0,2443	0,2605	0,0230	8,81%
0,002	0,4870	0,4812	0,4841	0,0041	0,84%
0,003	0,6353	0,6246	0,6270	0,0076	1,20%
0,004	0,8082	0,8214	0,8148	0,0093	1,14%
0,005	0,9932	0,9412	0,9672	0,0368	3,81%
0,006	1,2279	1,2202	1,2241	0,0054	0,44%



Slika 13. UV-VIS spektri standardnih otopina galne kiseline i FC reagensa.



Slika 14. Baždarni pravci 1 (■), jednadžba $A = 184,21c + 0,0933$; $R^2 = 0,9957$ i 2 (◆), jednadžba $A = 186,87c + 0,0661$; $R^2 = 0,9933$. Prikazuju ovisnost apsorbancije pri 725 nm o koncentraciji standardne otopine galne kiseline. Podaci su preuzeti iz Tablice 6.



Slika 15. Baždarni pravac jednadžbe $A = 187,65c + 0,0706$; $R^2 = 0,9957$ dobiven uzimajući srednje vrijednosti izmjerene apsorbancije. Podatci iz Tablice 6.

Mjerena apsorbancija uzorka metanolnog ekstrakta maslinovog ulja iznosila je 0,6115. Uvrštavanjem u jednadžbu baždarnog pravca dobivamo sljedeće:

$$0,6115 = 187,65c + 0,0706$$

Zaključujemo da je ukupna koncentracija polifenola u ispitivanom uzorku **0,002883 mol dm⁻³** ekvivalentna galne kiseline.

Da bi se dobila masena koncentracija u $\mu\text{g/mL}$, koristi se iduća formula:

$$c(\mu\text{g/mL}) = c(\text{mol dm}^{-3}) \times M_r(\text{galne kiseline}) \times 1000$$

$$M_r(\text{galne kiseline}) = 170,12$$

Uvrštavanjem dobivenog sadržaja u formulu dobije se koncentracija od **490,62 $\mu\text{g/mL}$** ekvivalentna galne kiseline.

Na temelju koncentracije ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu može se izračunati koncentracija ukupnih fenola u maslinovom ulju $c(\text{mg/kg})$:

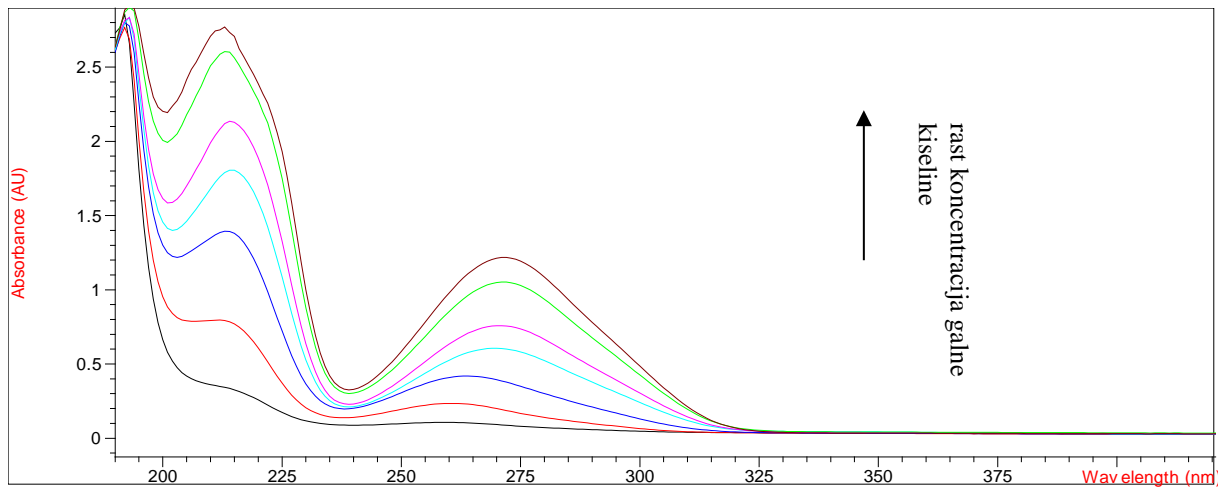
$$c\left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = \frac{c(\mu\text{g/mL}) \cdot V(\text{ekstrakta/mL})}{m(\text{maslinovog ulja/g})}$$

Masa uzorka maslinovog ulja iz kojega su ekstrahirani fenolni spojevi iznosila je 20,0 g, a volumen ekstrakta 2,0 mL. Iz tih se podataka dobije količina ukupnih fenola od **2,44 mg/kg uzorka**.

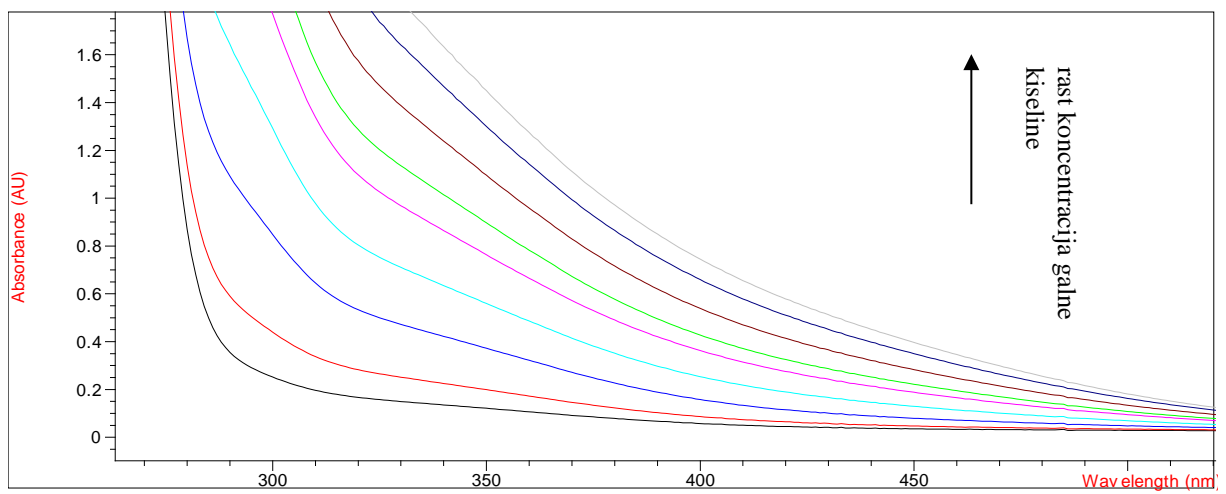
Određivanje *o*-difenola

Tablica 7. Podaci za izradu baždarnih pravaca za određivanje *o*-difenola u uzorku maslinovog ulja s Na-molibdatom.

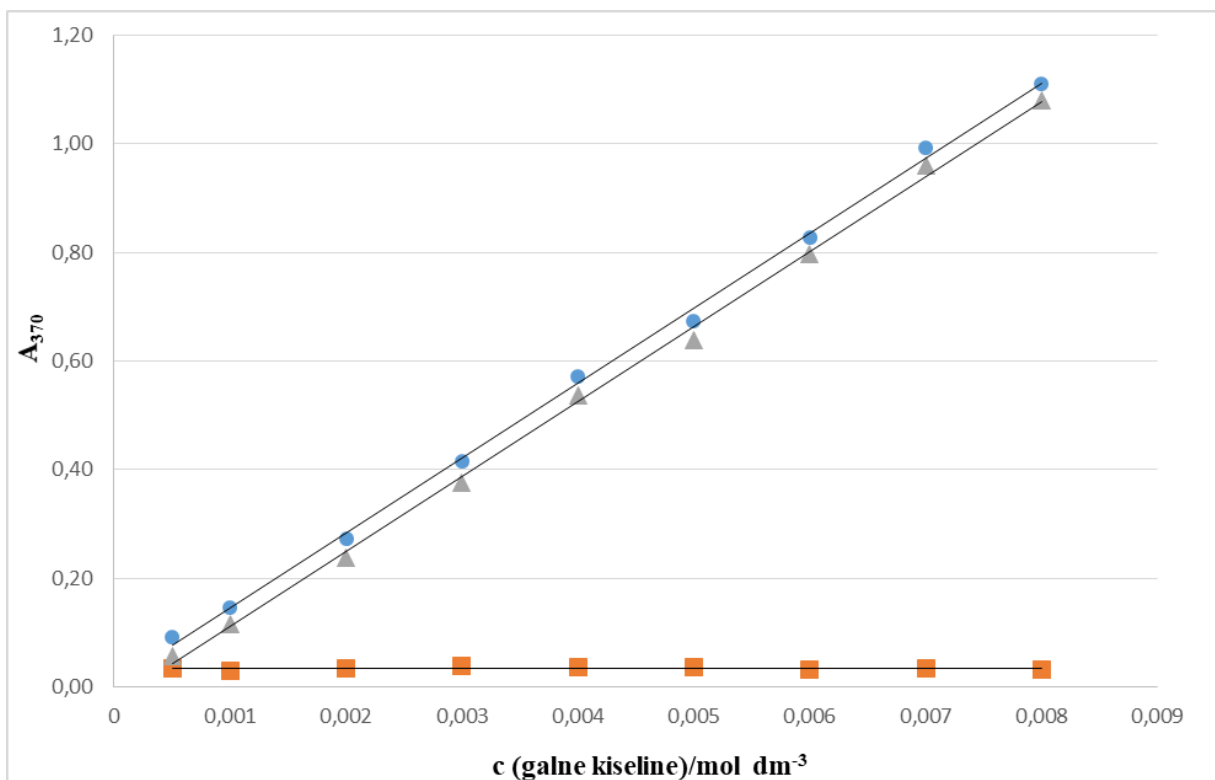
c (galne kiseline)/mol dm ⁻³	c (galne kiseline)/($\mu\text{g/mL}$)	A_{370} (uzorak)	A_{370} (slijepa proba)	ΔA_{370}
0,0005	85,06	0,0917	0,0342	0,0575
0,001	170,1	0,1462	0,0305	0,1157
0,002	340,2	0,2718	0,0330	0,2389
0,003	510,4	0,4147	0,0387	0,3760
0,004	680,5	0,5720	0,0353	0,5366
0,005	850,6	0,6731	0,0352	0,6379
0,006	1020	0,8288	0,0315	0,7973
0,007	1190	0,9937	0,0334	0,9603
0,008	1361	1,1116	0,0323	1,0793



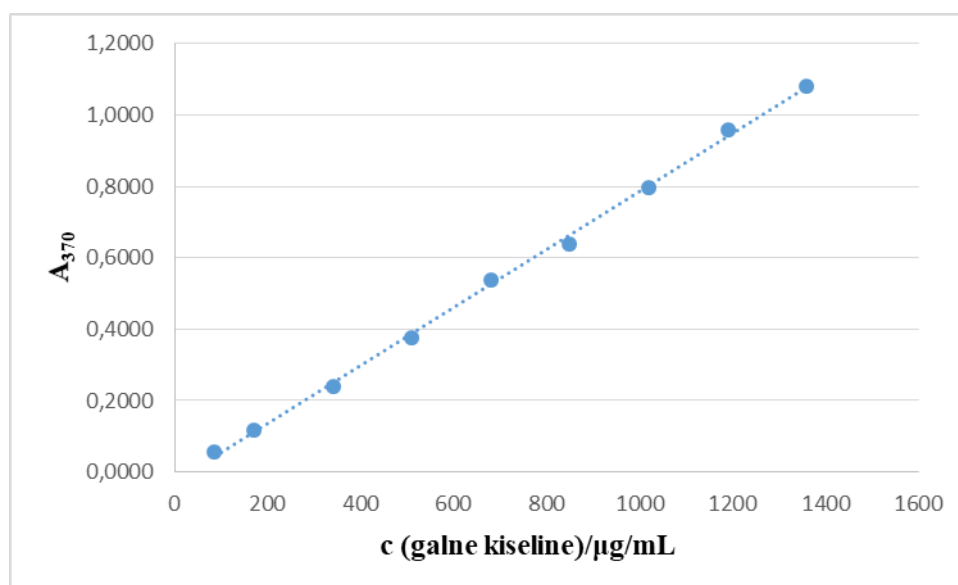
Slika 16. UV-VIS spektrislijepe probe (galna kiselina + metanol).



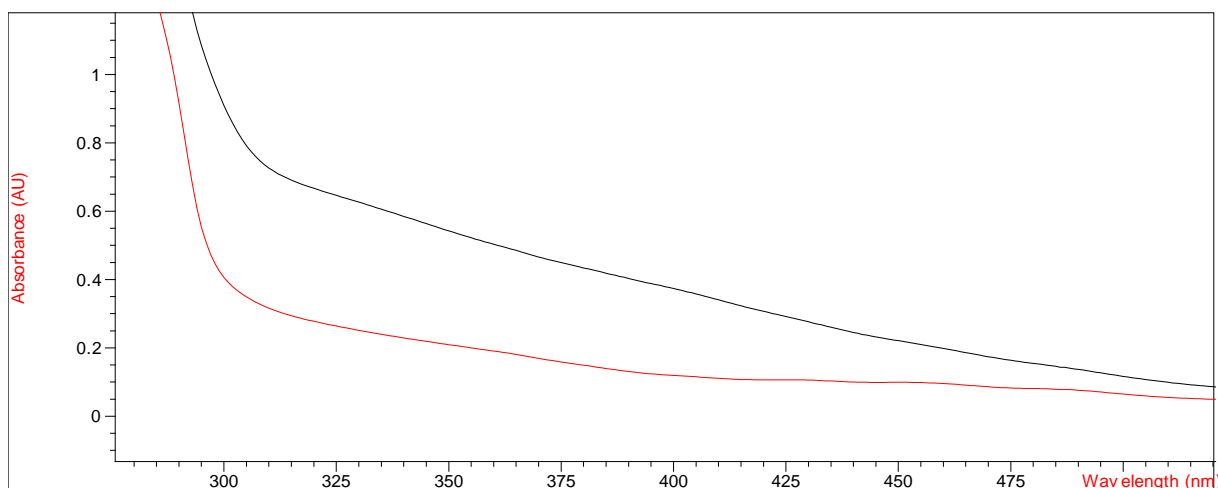
Slika 17. UV-VIS spektri otopina galne kiseline različitih koncentracija uz dodatak Na_2MoO_4 .



Slika 18. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline uz dodatak Na₂MoO₄ (●), jednadžba $A = 137,96c + 0,0076$; $R^2 = 0,9985$, u slijepoj probi s metanolom (■), te ovisnost ΔA_{370} (razlike u apsorbancijama između kivete s uzorkom i slijepom probom) o koncentraciji galne kiseline (▲), jednadžba $A = 138,05c - 0,0266$; $R^2 = 0,9984$. Podaci izvađeni iz Tablice 7.



Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije pri 370 nm o koncentraciji galne kiseline izražene u µg/mL, jednadžba pravca: $A = 0,0008115c - 0,026640$; $R^2 = 0,9984$. Podaci preuzeti iz tablice 7.



Slika 20. UV-VIS spektri uzorka ulja s Na_2MoO_4 (crno) i bez njega (crveno).

Izmjerena A_{370} u uzorku maslinovog ulja s dodatkom Na_2MoO_4 iznosila je 0,4661, a bez njega 0,1693. Volumen ekstrakta iznosio je 2.0mL, a masa uzorka 20 g.

Iz dobivenih mjerenja određuje se koncentracija *o*-difenola u uzorku, izražena u mol dm^{-3} , $\mu\text{g/mL}$ i mg/kg ekstrakta maslinovog ulja. Koncentracija je određena na temelju baždarnog pravca prikazanog na slici 4.7.

Dobiveni rezultati pokazuju da je u uzorku sadržano **$0,00234 \text{ mol dm}^{-3}$** tj. **$389,4 \mu\text{g/mL}$** *o*-difenola.

Koncentracija *o*-difenola u maslinovom ulju izračunana je prema formuli:

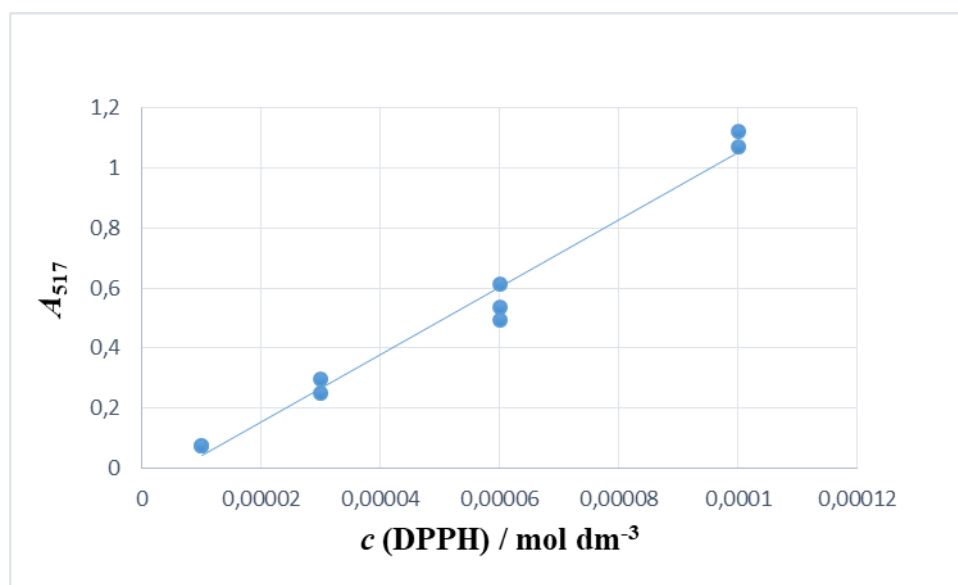
$$c \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{c(\mu\text{g/mL}) \cdot V(\text{ekstrakta/mL})}{m(\text{maslinovog ulja/g})}$$

Koncentracija *o*-difenola iznosila je **$1,99 \text{ mg/kg}$** maslinovog ulja.

4.2 Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

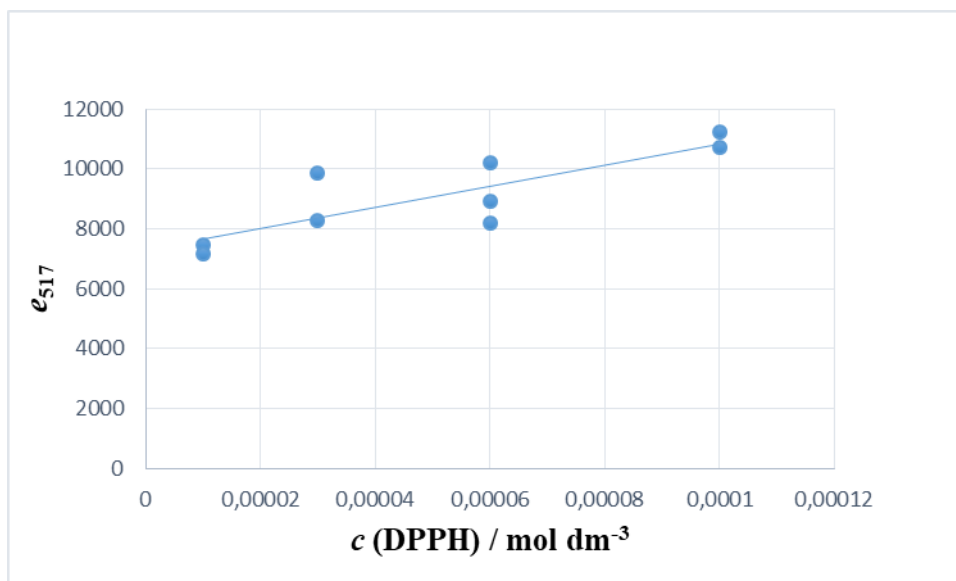
Tablica 8. Apsorbancija otopina DPPH različitih koncentracija i izračunati molarni apsorpcijski koeficijent u apsorpcijskom maksimumu pri 517 nm u metanolu.

uzorak	$c(\text{DPPH})$ / mol dm^{-3}	A_{517}	ϵ_{517}	$\bar{\epsilon}_{517}$	σ	E_r
1	0,0001	1,1217	11217	10964	359	3,27%
3	0,0001	1,0710	10710			
2	0,00006	0,5344	8907	8548	505	5,91%
4	0,00006	0,4915	8192			
5	0,00003	0,2962	9873	9074	1129	12,44%
6	0,00003	0,2483	8276			
7	0,00001	0,0748	7478	7323	219	2,99%
8	0,00001	0,0717	7168			



Slika 21. Ovisnost apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji DPPH radikala. Jednadžba pravca:

$$A = 11221c - 0,0712; R^2 = 0,9786.$$



Slika 22. Prikaz ovisnosti molarnog apsorpcijskog koeficijenta o koncentraciji DPPH.

Tablica 9. ApSORBANCijeotopine DPPH u metanolu praćene tijekom 30 minuta.

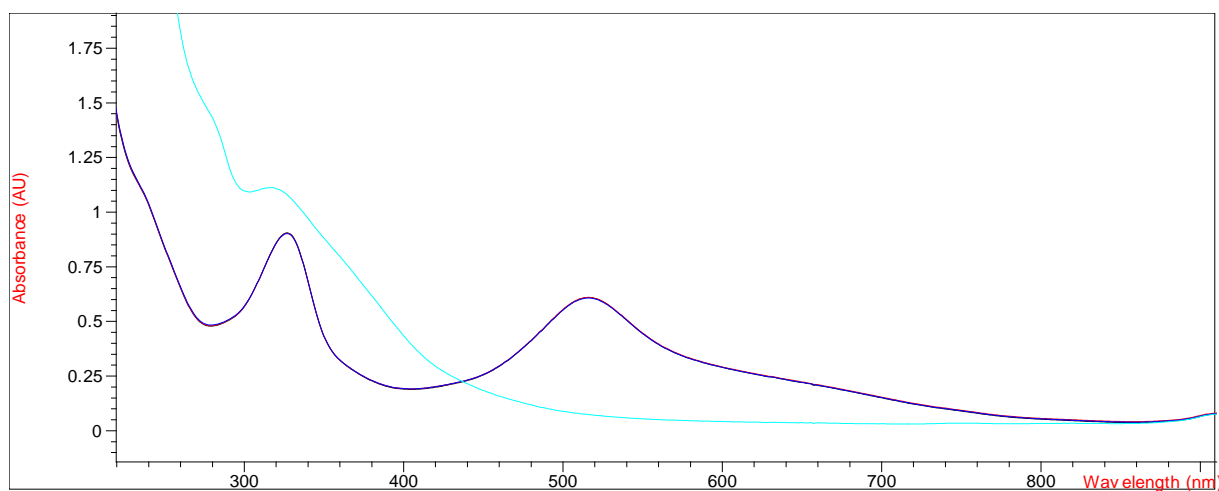
		slijepa proba 1	slijepa proba 2	slijepa proba 3	\bar{A}_{517}	SD	E_r
A_{517}	0 min	0,6120	0,6138	0,6073	0,6110	0,003388	0,55%
	20 min	0,6090	0,6101	0,6067	0,6086	0,001719	0,28%
	30 min	0,6081	0,6062	0,6048	0,6063	0,001657	0,27%

Na temelju praćenja apSORBANCije osnovne otopine DPPH u metanolu, možemo zaključiti da je sama otopina DPPH stabilna tijekom vremena praćenja reakcije s fenolnim ekstraktom, budući da se u 30 minuta apSORBANCija smanjila oko 1%.

Tablica 10. ApSORBANCije otopine DPPH u prisutnosti ekstrakta maslinovog ulja praćene tijekom 30 minuta.

t/min	A_{517}	
0	0,2015	$\bar{A}_{517} = 0,0732$
20	0,0731	
30	0,0733	

Uvrštavanjem u formulu za % antioksidacijske aktivnosti dobije se gašenje 67,02% DPPH radikala u trenutku miješanja te 87,95% nakon što se A ustalila.



Slika 23. UV-Visspektri slijepe probe DPPH (prikazano tamnoplavom, crvenom i crnom bojom – zadnje dvije nisu vidljive zbog preklapanja s tamnoplavom) te uzorka DPPH s fenolnim ekstraktom (svijetloplavom bojom).

4.2 Rasprava

U okviru diplomskog rada analitički su obrađeni uzorci maslinovog ulja. Cilj je bio odrediti radi li se uopće o ekstra djevičanskom maslinovom ulju, u skladu s propisima triju pravilnika o kvaliteti maslinovog ulja: IOOC, EC i Codex Alimentarius (Boskou i sur., 2006). Također, zbog dokazane djelotvornosti antioksidacijskih polifenolnih spojeva u prevenciji i terapiji različitih komorbiditeta, određivala se njihova koncentracija te antioksidacijska aktivnost s DPPH testom.

Rezultati ispitivanja pokazali su da su analizirani uzorci uistinu iz kategorije ekstra djevičanskih maslinovih ulja, sa sadržajem slobodnih masnih kiselina (%) redom: 0,302, 0,195, 0,190 izraženih kao % oleinske kiseline. Prema propisima, ekstra djevičanska maslinova ulja sadrže <0,8% slobodnih masnih kiselina (Boskou i sur., 2006).

Ukupna koncentracija polifenola određena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom. Mehanizam reakcije temelji se na mjerenju apsorpcije pri 725 nm reduciranih molibdatnih specija iz FC reagensa elektronima iz polifenola nakon čuvanja smjese sat vremena u mraku. Izmjerena je apsorpcija niza standardnih otopina galne kiseline, koncentracija redom: 0,001; 0,002; 0,003; 0,004; 0,005; 0,006 mol dm⁻³. Napravljena su dva niza mjerenja. Dobivene su dobre linearne ovisnosti ($R^2 = 0,9957$; $R^2 = 0,9933$) s jednadžbama: $A = 184,21c + 0,0933$; te $A = 186,87c + 0,0661$. Koristeći prosječne vrijednosti svih izmjerenih apsorpcija kod određene koncentracije dobiven je baždarni pravac jednadžbom $A = 187,65c + 0,0706$; $R^2 = 0,9957$. Na temelju ovog baždarnog pravca određena je koncentracija ukupnih fenola u ispitanom metanolnom ekstraktu u iznosu od 0,002883 mol dm⁻³ ekvivalenta galne kiseline, odnosno 2,44 mg/kg maslinovog ulja.

Koncentracija *o*-difenola, biomedicinski posebno zanimljivih fenolnih spojeva, određuje se selektivnijom metodom, točnije reakcijom s Na₂MoO₄. Mehanizam je sličan onom s FC reagensom – dolazi do redukcije molibdata iz (VI) u (V) te se mjeri apsorpcija, ovog puta pri 317 nm nakon čuvanja u mraku 15 minuta. Ponovno je izrađen baždarni pravac, ovaj put s koncentracijama standardne otopine galne kiseline: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,003; 0,004; 0,005; 0,006; 0,007; 0,008 mol dm⁻³ te su se paralelno mjerile apsorpcije slijepe probe (standardna otopina galne kiseline + metanol/voda = 1/1 v/v) te uzorka (standardna otopina galne kiseline + Na₂MoO₄). Dobivena je vrlo dobra linearna ovisnost izmjerene A_0 koncentraciji galne kiseline s jednadžbom: $A = 137,96c + 0,0076$; $R^2 = 0,9985$. Jednadžba baždarnog pravca ovisnosti razlike apsorpcije uzorka i slijepe probe (ΔA) o koncentraciji standardnih otopina galne kiseline glasi $A = 138,05c - 0,0266$; $R^2 = 0,9984$. Zadnje navedena jednadžba pravca pravca je korištena za određivanje koncentracije *o*-difenola u metanolnom ekstraktu, te je u ispitanom

uzorku ekstrakta maslinovoguljautvrđena koncentracija $0,00234 \text{ mol dm}^{-3}$ ekvivalenatagalne kiseline. Na temelju ovisnosti ΔA o masenoj koncentracijigalne kiseline dobiven je pravac s jednadžbom $A = 0,0008115c - 0,0266040$; $R^2 = 0,9984$. Iz njega se može odrediti i koncentracija *o*-difenolaizražena u $\mu\text{g/ml}$ ekvivalenatagalne kiseline te je u ispitanom uzorku ekstrakta maslinovog ulja iznosila $398,4 \mu\text{g/mL}$. Na temelju koncentracije *o*-difenola u metanolnom ekstraktu izračunata je koncentracija*o*-difenola u uzorku maslinovog ulja, uzimajući u obzir masu ulja koje je ekstrahirano i volumen metanola u kojemu je otopljen suhi ekstrakt, tj. pripremljen metanolni ekstrakt za analizu. Na temelju odvage uzorka od $20,0 \text{ g}$ i volumena alikvota od $0,1 \text{ mL}$ dobila se koncentracija od $1,99 \text{ mg/kg}$.

Određena je i antioksidacijska aktivnost fenolnog ekstrakta maslinovog ulja, uz primjenu antioksidacijskogDPPH testa. DPPH ima apsorpcijski maksimum pri 517 nm , na ovoj valnoj duljini molarni apsorpcijski koeficijent reduciranog radikala je zanemariv. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta se određuje iz izmjerenog smanjenja A pri 517 nm u prisutnosti fenolnog ekstrakta. Apsorbancija se mjeri odmah nakon dodavanja DPPH u uzorak, nakon 20 minuta i nakon 30 minuta, kad bi se Atrebala ustaliti. Neposredno nakon dodatka uzorka u otopinu DPPH, antioksidacijska aktivnost iznosila je $67,02\%$, dok je konačna aktivnost iznosila $87,95\%$. Na temelju izračunatih vrijednosti dobije se EC_{50} u iznosu od $366,03 \mu\text{g/mL}$ ekvivalenata galne kiseline.

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitani uzorci maslinovog ulja pripadaju kategoriji ekstra djevičanskog maslinovog ulja, zadovoljavajući zahtjev za udjelom slobodnih masnih kiselina $< 0,8\%$, izraženih kao % oleinske kiseline.
2. Izrađen je baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih fenola. U ispitanom uzorku maslinovog ulja određena je koncentracija ukupnih fenola u iznosu 2,44 mg/kg maslinovog ulja.
3. Izrađen je baždarni pravac za određivanje koncentracije *o*-difenola. U ispitanom uzorku maslinovog ulja određena je koncentracija *o*-difenola u iznosu od 1,99 mg/kg maslinovog ulja.
4. Proveden je test antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom. Utvrđeno je da fenolni ekstrakt maslinovog ulja dovodi do gašenja 87,95% radikala.
5. Ispitana ulja vrijedan su izvor fenolnih spojeva, sa znatnim udjelom *o*-difenola koji su od posebne biomedicinske važnosti.
6. Preporuča se češća konzumacija maslinovog ulja kako bi se prevenirale brojne bolesti uzrokovane toksičnim djelovanjem slobodnih radikala.

6. LITERATURA

- Alessandri S, Ieri F, Romani A. Minor Polar Compounds in Extra Virgin Olive Oil: Correlation between HPLC-DAD-MS and the Folin-Ciocalteu Spectrophotometric Method. *J Agric Food Chem*, 2014, 62, 826-835
- Andreadou I, Mikros, E, Ioannidis K, Sigala E, Naka K, Kostidis S, Farmakis D, Tenta R, Kavantzias H, Bibli SI et al. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 69, 4-16.
- Angerosa F, Campestre C, Giansante L. Analysis and Authentication. U Olive Oil Chemistry and Technology. Boskou D, AOCS Press, 2006, 113-172.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014.
- Aydal AY. Emerging Technologies in Olive Oil Production. U: Technological Innovation in the Olive Oil Production Chain [Working Title]. Muzzalupo I, Intech Open, 2018.
- Bancuta I, Chilian A, Ion RM. Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Rom J Phys*, 2016, 61, 1255-1264.
- Boskou D, Tsimidou M, Blekas G. Polar Phenolic Compounds. U: Olive Oil Chemistry and Technology. Boskou D, urednik, Urbana, AOCS Press, 2006, str. 73-92.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm-Wiss Technol*, 1995, 28, 25-30.
- Chapter IV: Sodium molybdate – Ortho dihydroxy phenol reactions, https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/57243/8/08_chapter%204.pdf, pristupljeno 15.9.2019.
- Determination of Biophenols in Olive Oils by HPLC, 2009, Madrid, International Olive Oil Council. (COI/T.20/Doc No 29)
- Fernández De La Mora J. The Fluid Dynamics of Taylor Cones. *Annu Rev Fluid Mech*. 39, 2007, 217-243.
- Gelpi E, Posada de la Paz M, Terracini B, Abaitua I, Gomez de la Camara A, Kilbourne EM, Lahoz C, Nemery B, Philen RM, Soldevilla L, Takrowski S. The Spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: a multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ Health Perspect*, 2002, 110, 457-464.

Illustrated Glossary of Organic Chemistry,

http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/A/alpha_tocopherol.html, pristupljeno 10.9.2019.

Jakobušić Brala C, Benčić Đ, Šindrak Z, Barbarić M, Uršić S. Labeled extra virgin olive oil as Food Supplement: Phenolic Compounds in Oils From Some Autochthonous Croatian Olives. *Gracas y Aceites*, 66, 2015, 4:E099-1.

Karković Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 2019, 24, 2001.

Lozano-Castellón J, López-Yerena A, Rinaldi de Alvarenga JF, Romero Del Castillo-Alba J, Vallverdú-Queralt A, Escribano-Ferrer E, Lamuela-Raventós RM. Health-promoting properties of oleocanthal and oleacein: Two secoiridoids from extra-virgin olive oil. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 1-17.

Lushchak V, Semchyshyn H. Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects. *Intech Open*, 2012.

Maslinina muha (*Bactroceraoleae*). <https://www.chromos-agro.hr/maslinina-muha-bactroceraoleae/>, pristupljeno 26.8.2019.

Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Rios JJ, Leon-Camacho M, Alcludia F, Cert A. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 2185-2192.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007, 7, 80.

Orešković J, Barbarić M, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Benčić Đ. Određivanje bioaktivnih antioksidansa u ekstra djevičanskom maslinovom ulju iz Hrvatske. *6th International Congress of Nutritionists, Book of abstracts*, 2018, 125.

Parkinson L, Cicerale S. The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules*, 2016, 21, 1734.

Preedy VR, Watson RR. Olives and olive oil in Health and Disease Prevention. Elsevier, 2010., str. 171.

Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. U: Lipid Peroxidation. Catala A. Rijeka, InTech, 2012, str. 3-30.

- Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci*, 2016, 17, 843.
- Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org Mol Biochem*, 2005, 3, 423-430.
- Scherf-Clavel O. Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore. 2016.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*. 1999, 299, 152-178.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. U: Osnove analitičke kemije. Skoog DA, West Dm, Holler FJ, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 692-716.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. U: Osnove analitičke kemije. Skoog DA, West Dm, Holler FJ, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 645-672.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabbachi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 2005, 18, 98-112.
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutra Biochem*, 2002, 13(11), 636-633.
- Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV). http://www.rsc.org/learn-chemistry/content/filerepository/CMP/00/001/304/UV-Vis_Student%20resource%20pack_ENGLISH.pdf, pristupljeno 22.9.2019.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Maslinovo ulje bogato je polifenolnim spojevima s jakim antioksidacijskim učinkom. Istraživanja su pokazala da konzumacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja pomaže u prevenciji brojnih bolesti modernog doba uzrokovanih stresnim i nezdravim načinom života. Upravo supolifenolni spojevi, zahvaljujući smanjenju štetnog djelovanja slobodnih radikala na lipide u tijelu, zaslužni za barem dio navedenih učinaka. U ovom diplomskom radu određen je sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i *o*-difenola u uzorku maslinovog ulja, te je određena antioksidacijska aktivnost fenolnog ekstrakta ulja s DPPH testom. Za tu svrhu su izrađeni odgovarajući baždarni pravci, sa standardnom otopinom galne kiseline. Određen je sadržaj slobodnih masnih kiselina, te je utvrđeno da ispitana ulja pripadaju u kategoriju ekstra djevičanska. Rezultati analize pokazuju da je ispitano maslinovo ulje vrijedan izvor fenolnih spojeva sa znatnim udjelom posebno biomedicinski zanimljivih *o*-difenola, što je dodatno potvrđeno i s DPPH antioksidacijskim testom.

7.2. Summary

Olive oil is rich in polyphenolic compounds, that have been proven to show antioxidative activity. Numerous researches showed that consuming extra virgin olive oil helps with preventing many diseases associated with modern age unhealthy lifestyle. It's the antioxidants contained in it that are to be thanked for a solid portion of said effects. In this thesis, total phenolic and *o*-diphenol content was determined in an olive oil sample, as well as its phenolic extractant oxidative activity with DPPH method. For this purpose, calibrating lines were obtained, using standard gallic acid solution. Further more, free fatty acid content was determined and it was shown that the analyzed olive oil sample actually was an extra virgin olive oil sample.

The results of this analysis show that the analyzed olive oil is rich in phenolic compounds, particularly in biomedically relevant *o*-diphenols. This was also confirmed with DPPH antioxidative test.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION
CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Fizikalnu kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje sadržaja polifenola u ekstra djevičanskom maslinovom ulju

Andrea Bošković

SAŽETAK

Maslinovo ulje bogato je polifenolnim spojevima s jakim antioksidacijskim učinkom. Istraživanja su pokazala da konzumacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja pomaže u prevenciji brojnih bolesti modernog doba uzrokovanih stresnim i nezdravim načinom života. Upravo su polifenolni spojevi, zahvaljujući smanjenju štetnog djelovanja slobodnih radikala na lipide u tijelu, zaslužni za barem dio navedenih učinaka. U ovom diplomskom radu određen je sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i *o*-difenola u uzorku maslinovog ulja, te je određena antioksidacijska aktivnost fenolnog ekstrakta ulja s DPPH testom. Za tu svrhu su izrađeni odgovarajući baždarni pravci, sa standardnom otopinom galne kiseline. Određen je sadržaj slobodnih masnih kiselina, te je utvrđeno da ispitana ulja pripadaju u kategoriju ekstra djevičanska. Rezultati analize pokazuju da je ispitano maslinovo ulje vrijedan izvor fenolnih spojeva sa znatnim udjelom posebno biomedicinski zanimljivih *o*-difenola, što je dodatno potvrđeno i s DPPH antioksidacijskim testom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 23 grafičkih prikaza, 10 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ekstra djevičansko maslinovo ulje, polifenoli, *o*-difenoli, antioksidansi, Folin-Ciocalteu reagens, DPPH, natrij molibdat

Mentor: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Ana Karković Marković, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Monika Barbarić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Physical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Phenolic compound determination in extra virgin olive oil

Andrea Bošković

SUMMARY

Olive oil is rich in polyphenolic compounds, that have been proven to show antioxidative activity. Numerous researches showed that consuming extra virgin olive oil helps with preventing many diseases associated with modern age unhealthy lifestyle. It's the antioxidants contained in it that are to be thanked for a solid portion of said effects. In this thesis, total phenolic and *o*-diphenol content was determined in a native olive oil sample, as well as its phenolic extractant antioxidative activity with DPPH method. For this purpose, calibrating lines were obtained, using standard gallic acid solution. Furthermore, free fatty acid content was determined and it was shown that the analyzed olive oil sample actually was an extra virgin olive oil sample. The results of this analysis show that the analyzed olive oil is rich in phenolic compounds, particularly in biomedically relevant *o*-diphenols. This was also confirmed with DPPH antioxidative test.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 23 figures, 10 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: extra virgin olive oil, polyphenols, *o*-diphenols, antioxidants, Folin-Ciocalteu reagent, DPPH, sodium molybdate

Mentor: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Karković Marković, Ph.D., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Monika Barbarić, Ph.D., Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.