

Danijela Butković

**Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih
polifenola i antioksidativne aktivnosti hrvatskih
maslinovih ulja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr. sc. Daniele Amidžić Klarić. Izradu diplomskog rada financirala je Zaklada Adris.

Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, na posvećenom vremenu, stručnom vodstvu i savjetima kojima mi je pomogla u uspješnoj izradi ovog diplomskog rada. Osim iznimne profesionalnosti, hvala joj na brizi, toplini i ohrabrenjima kojima me je vodila kroz ovaj put!

Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, voditeljici projekta „Razvoj novih analitičkih metoda kao preduvjet proizvodnje visoko kvalitetnog i ekološki dobivenog maslinovog ulja“, koji je financirala Zaklada Adris.

Veliko hvala mojoj obitelji, koja mi je bila bezuvjetna podrška kako tijekom studiranja, tako i uvijek u životu.

Zahvale upućujem i svojim prijateljima, koji su mi uljepšali studentske dane.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MASLINOVO ULJE	2
1.1.1. Kemijski sastav maslinovog ulja.....	2
1.1.2. Parametri kakvoće maslinovog ulja	4
1.1.3. Kategorizacija maslinovih ulja.....	5
1.2. POLIFENOLI.....	6
1.2.1. Polifenoli maslinovog ulja	6
1.2.2. Djelovanje polifenola maslinovog ulja	8
1.3. ANTIOKSIDANSI	9
1.3.1. Lipidna oksidacija i antioksidansi.....	9
1.3.2. Fenolni antoksidansi	10
1.3.3. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	10
1.3.3.1. ABTS metoda.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Uzorci	16
3.1.3. Radni instrumenti	16
3.1.4. Pribor.....	16
3.1.5. Programski paketi.....	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	17
3.2.2. Ekstrakcija polifenola metodom tekuće-tekuće	17
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola primjenom UV-VIS spektrofotometrije	18
3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS metodom.....	18
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju	21
4.2. Procjena antioksidativne aktivnosti maslinovog ulja.....	22
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/SUMMARY	34

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC
DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. MASLINOVO ULJE

Maslinovo ulje dobiva se iz ploda masline. Najzastupljenija vrsta masline na Mediteranu je *Olea Europaea* L.= *O. sativa* (Hoffmg. et Lk.) Fiori iz porodice *Oleaceae* (Domac R., 2002), koja postoji u više od 700 različitih lokalnih sorti koje nazivamo kultivarima. Masline se uzgajaju na području koje se prostire između 35. i 45. paralele sjeverne zemljopisne širine, čiji klimatski uvjeti odgovaraju njezinim potrebama u smislu minimalne i maksimalne temperature. Prije početka sazrijevanja, plodovi masline još uvijek ne sadrže ulje, već niz organskih kiselina i šećera. Ulje se počinje stvarati tijekom sazrijevanja ploda, te dostiže najveću količinu u trenutku kada maslina dostigne svoju najintenzivniju boju koja ovisno o sorti masline može biti od svijetlo zelene do tamno ljubičaste. (www.dignano.wordpress.com) Kad plod masline sazrije, njegov sastav je sljedeći: 50% voda, 22% ulje, 19% ugljikohidrati, 6% celuloza, 1,6% proteini, 1,5% pepeo i 1-3% polifenoli. Nadalje, konačni sastav maslinovog ulja i njegova kvaliteta, osim o već spomenutim faktorima, ovisit i o načinu prerade plodova (D' Antuono i sur., 2018).

1.1.1 Kemijski sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje sastavljeno je od osapunjivog (99%) i neosapunjivog dijela (1%). Osapunjivi dio uglavnom čine trigliceridi, koji u svom sastavu imaju određene masne kiseline. Sadržaj masnih kiselina varira ovisno o sorti masline, stupnju zrelosti ploda, nadmorskoj visini, klimi i drugim čimbenicima. Međunarodni savjet za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council*, IOOC) ustanovio je sljedeće granične vrijednosti za sastav masnih kiselina u maslinovom ulju:

Palmitinska kiselina (16:0)	7,5-20,0 %
Palmitoleinska kiselina (16:1, n-7)	0,3-3,5 %
Stearinska kiselina (18:0)	0,5-5,0 %
Oleinska kiselina (18:1 n-9)	55,0-83,0 %
Linolna kiselina (18:2 n-6)	3,5-21,0 %
α - linolenska kiselina (18:3 n-3)	0,0-1,5 %

Iz navedenih vrijednosti vidljivo je da u sastavu masnih kiselina maslinovog ulja prevladava jednostruko nezasićena oleinska kiselina, mali udio imaju zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska, te višestruko nezasićene masne kiseline, linolna i α - linolenska, koje kao esencijalne masne kiseline daju posebno biološko značenje maslinovom ulju. Dakle,

prirodno maslinovo ulje visoke kakvoće ima umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina (oko 16%), izrazito visok udio oleinske kiseline (70-80%) i optimalnu količinu višestruko nezasićenih esencijalnih masnih kiselina (8-10%). Takav sastav masnih kiselina razlikuje maslinovo ulje od drugih jestivih masti i ulja, te ga čini vrjednijim.

Neosapunjivi dio čine ugljikovodici, tokoferoli, steroli, fenolne tvari, alifatski alkoholi i dr. Neki od ovih sastojaka imaju terapijski učinak, drugi predstavljaju osnovni element arome ulja (mirisi, okusi), a velika skupina spojeva su djelotvorni prirodni antioksidansi, koji povećavaju otpornost ulja na kvarenje.

Ugljikovodici sačinjavaju oko 60% neosapunjivog dijela maslinovog ulja, odnosno ugljikovodici su najzastupljenija skupina spojeva neosapunjive frakcije. 60-70% ukupnih ugljikovodika odnosi se na skvalen, koji ima ulogu preteče za spojeve koji djeluju na prehrambene karakteristike ulja. Preostali dio čine zasićeni alifatski ugljikovodici i dienski ugljikovodici, koji su važni za dokazivanje karakteristika autentičnosti i kakvoće.

Tokoferoli su prirodni antioksidansi, koji sprječavaju oksidacijsko kvarenje ulja. Maslinovo ulje sadrži α , β , γ i δ oblike, od kojih je najzastupljeniji α -oblik (vitamin E), koji ujedno ima i najznačajniju biološku aktivnost. Kako bi α -tokoferol imao spomenutu zaštitnu ulogu, kvantitativni odnos između vitamina E (izražen u mg) i linolne kiseline (izražen u g) ne bi trebao biti manji od 0,79 mg/g. U maslinovom ulju taj odnos je oko 3 mg/g.

Kao tokoferoli, i steroli imaju ulogu prirodnih antioksidansa, koji sprječavaju oksidacijsko kvarenje ulja. Najvažniji među njima, zbog svoje biološke vrijednosti, je β - sitosterol, koji smanjuje crijevnu apsorpciju viška kolesterola. Određivanjem sastava sterola danas je moguće potvrditi izvornost i čistoću proizvoda. Ukupni β - sitosterol zastupljen je u maslinovom ulju od 93 do 97%.

Fenolni spojevi se u maslinovom ulju nalaze u malim količinama. Brojnim znanstvenim radovima dokazano je njihovo antioksidacijsko djelovanje i biološka aktivnost. Novija istraživanja pokazuju važan utjecaj polifenola na stabilnost maslinovog ulja te njegova prehrambena i biološka svojstva. Nadalje, utvrđeno je sinergističko djelovanje između polifenola i α -tokoferola na stabilnost djevičanskog maslinovog ulja. Prirodna maslinova ulja, a naročito ekstra djevičansko maslinovo ulje, sadržavaju značajnu količinu polifenolnih spojeva (50-500 mg/kg). Glavni polifenolni spoj u maslinovom ulju je oleuropein, koji ulju daje karakterističnu gorčinu.

Klorofil je zeleni pigment, koji maslinovom ulju daje karakterističnu boju. Maslinovo ulje dobiveno preradom zelenih plodova ima više klorofila i izraženiju zelenu boju. U tami ovi pigmenti djeluju kao antioksidansi, dok u prisutnosti svjetla pospješuju oksidaciju ulja. Maslinovo ulje sadrži i alifatske i triterpenske alkohole, koji imaju ulogu intermedijara u transformacijama koje se odnose na skvalen i prethode nastajanju sterola.

U neosapunjivom dijelu maslinovog ulja nalaze se i aldehidi, ketoni, esteri i dr. spojevi, koji sudjeluju u stvaranju specifične arome maslinovog ulja, te se zbog toga nazivaju tzv. 'spojevi arome' (Žanetić i Gugić, 2006).

1.1.2. Parametri kakvoće maslinovog ulja

Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine masline (NN br.7/2009) definirani su osnovni parametri kakvoće maslinovog ulja: udio ukupnih slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, koeficijent ekstincije K232 i K270 te organoleptička svojstva.

Udio slobodnih masnih kiselina dogovorno se izražava kao kiselost, odnosno kao masa u gramima slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g ulja.

Peroksidni broj je količina onih tvari u uzorku, izražena u milimolima aktivnog kisika po kilogramu ulja, koje oksidiraju kalij jodid u opisanim radnim uvjetima. Može se izraziti i u miliekvivalentima aktivnog kisika po kilogramu ulja.

Spektrofotometrijsko određivanje u ultraljubičastom području može pružiti podatke o kvaliteti ulja, njezinom stanju očuvanosti i promjenama uzrokovanim tehnološkim procesima. Do apsorbancije na određenim valnim duljinama dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava. Te apsorbancije izražene su kao specifične ekstinkcije E1% 1 cm (ekstinkcija 1%-tne otopine masti u specifičnom otapalu, s duljinom puta od 1 cm) i dogovorno se označavaju s K (također i kao „ koeficijent ekstinkcije“).

Provjeru organoleptičkih svojstava ulja provodi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole, posredstvom grupa odabranih i osposobljenih ocjenjivača senzornih svojstava djevičanskih maslinovih ulja ovlaštenih od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

1.1.3. Kategorizacija maslinovih ulja

Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine masline (NN br.7/2009) ulja se razvrstavaju u šest kategorija pod sljedećim nazivima:

1. *Djevičanska maslinova ulja*

Za proizvodnju ekstra djevičanskog maslinovog ulja i djevičanskog maslinovog ulja koriste se plodovi stabla masline (*Olea europea L.*) koji se podvrgavaju isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. Ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje može se podvrgnuti isključivo postupcima pranja, centrifugiranja, dekantacije i/ili filtracije.

- a) Djevičansko maslinovo ulje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.
 - b) Ekstra djevičansko maslinovo ulje sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.
 - c) Maslinovo ulje lampante je djevičansko maslinovo ulje neprihvatljivih senzornih svojstava, koje sadrži više od 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.
2. *Rafinirano maslinovo ulje* je ulje dobiveno rafinacijom djevičanskog maslinovog ulja, a sadrži najviše 0,3 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.
 3. *Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja* je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja osim maslinovog ulja lampante, koje ne sadrži više od 1 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.
 4. *Sirovo ulje komine maslina* je ulje dobiveno preradom komine maslina mehaničkim postupcima i/ ili ekstrakcijom komine maslina organskim otapalima, bez rafinacije i reesterifikacije, te bez miješanja s uljima druge vrste.
 5. *Rafinirano ulje komine maslina* je ulje dobiveno rafinacijom sirovog ulja komine maslina, koje ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.
 6. *Ulje komine masline* je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog ulja komine maslina i djevičanskih maslinovih ulja osim maslinovog ulja lampante, koje ne sadrži više od 1 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.

1.2. POLIFENOLI

Polifenoli su jedna od najvećih skupina kemijskih tvari poznatih u biljnom svijetu. Poznato je više od 8 000 polifenolnih struktura, uključujući nekoliko stotina izoliranih iz jestivih izvora. Dobar izvori polifenola su međuostalim: voće, povrće, orašasti plodovi i sjemenke, korijenje, kora i listovi različitih biljaka, bilje, cjelovite žitarice, čaj, kava i vino. Dnevni unos polifenola prehranom kreće se u rasponu 0,1-1,0 g.

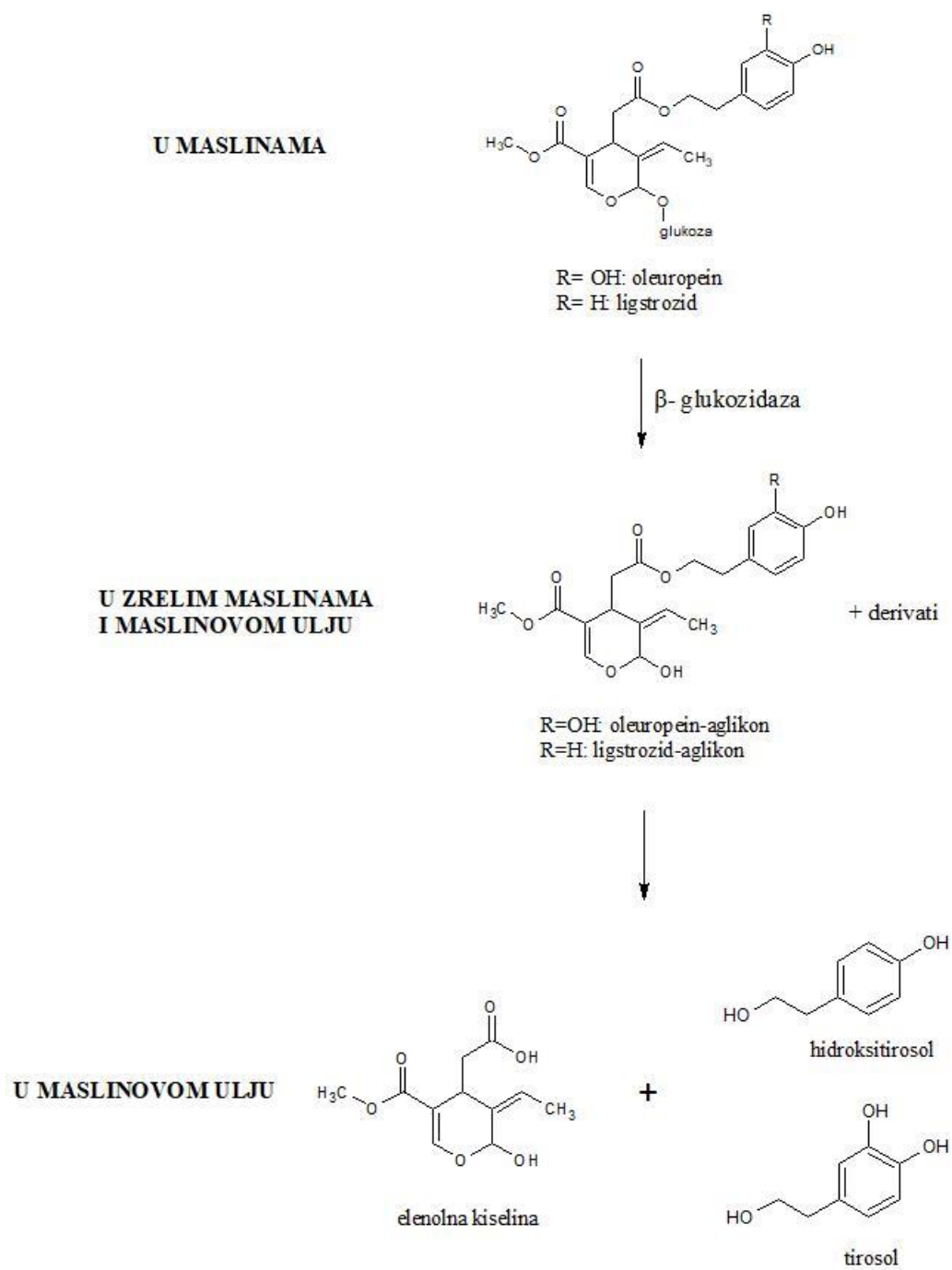
Polifenoli su prirodni ili polusintetski organski spojevi, koji u svojoj strukturi sadrže višestruke fenolne skupine. Prirodni bioaktivni polifenoli su spojevi različitih kemijskih struktura. U pravilu, sadrže jedan ili više aromatskih prstenova supstituiranih s hidroksilnim skupinama. (Gorzynik-Debicka i sur., 2018)

1.2.1. Polifenoli maslinovog ulja

Najvažnija odlika ploda masline i ekstra djevičanskog maslinovog ulja je visok sadržaj fenolnih komponenti koje se razlikuju po sastavu i zastupljenosti (Borges i sur., 2017).

Ukupni udio fenola, ali i udio pojedinačnih fenolnih sastavnica u djevičanskom maslinovom ulju ovisi o sorti (genetskoj osnovi), klimatskim prilikama tijekom dozrijevanja plodova, stupnju dozrelosti plodova iz kojih se izdvaja ulje, te načinu ekstrakcije ulja (Šindrak i sur., 2007).

Fenolne sastavnice u plodovima masline su polarni glikozidi: oleuropein i ligstrozid. Oleuropein je ester elenolne kiseline i hidroksitirosola (HT). Ligstrozid je ester elenolne kiseline i tirosola (T). Dozrijevanjem maslina raste aktivnost β -glukozidaze čijim djelovanjem nastaju nepolarni oleuropein- i ligstrozid- aglikoni, što prikazuje **Slika 1**. Tirosol, hidroksitirosol i njihovi sekoiridoidni derivati čine oko 90% ukupnih fenola prisutnih u maslinovom ulju (Vissers i sur., 2004).



Slika 1. Polifenoli u maslinama i maslinovom ulju (preuzeto iz Vissers i sur., 2004)

1.2.2. Djelovanje polifenola maslinovog ulja

Ekstra djevičansko maslinovo ulje sadrži mješavinu polifenola s jednom odnosno s dvjema hidroksilnim skupinama. Polifenoli s dvije ili više hidroksilnih skupina imaju snažnu antioksidativnu aktivnost *in vitro*, dok je kod polifenola s jednom hidroksilnom grupom taj učinak puno slabiji, ili ga nema (Vissers i sur., 2004).

Iz gore navedenog proizlazi da su polifenoli učinkoviti prirodni antioksidansi, koji štite maslinovo ulje od autooksidacijskih promjena, te na taj način pridonose stabilnosti ulja u smislu očuvanja njegove kakvoće i trajnosti. Drugim riječima, fenolne tvari zapravo štite nezasićene masne kiseline, koje se nalaze u sastavu triglicerida maslinovog ulja, od oksidacije (Šindrak i sur., 2007). Osim toga, fenolne tvari utječu i na svojstva okusa poput pikantnosti (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

Prirodni polifenoli igraju ključnu ulogu u metabolizmu ljudskog organizma. Utvrđeno je da polifenoli smanjuju morbiditet i/ili usporavaju progresiju kardiovaskularnih, neurodegenerativnih bolesti i raka. Mehanizam djelovanja polifenola povezuje se s njihovom antioksidativnom aktivnošću. Tako je poznato da polifenoli smanjuju razinu reaktivnih kisikovih spojeva u ljudskom organizmu (Gorzynik-Debicka i sur., 2018). Antiaterogeno djelovanje posljedica je vezanja polifenola za LDL čestice i sprječavanja njihove oksidacije (Perona i sur., 2006). Osim toga, prirodni polifenoli djeluju i protuupalno, antialergijski, antimutageno, te sprječavaju oštećenje DNA (antikancerogeno djelovanje) i ekspresiju adhezijskih molekula (Gorzynik-Debicka i sur., 2018). Antitrombotski učinak, odnosno inhibicija agregacije trombocita izazvana hidroksitirozolom, jednako je učinkovita kao acetilsalicilna kiselina. Nadalje, polifenoli iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja smanjuju krvni tlak pojačavajući ekspresiju eNOS, a NO djeluje kao vazodilatator (Keys i sur., 1981).

Istražuje se i mogućnost djelovanja polifenola na moduliranje ljudskog imunološkog sustava, utječući na proliferaciju i aktivnost bijelih krvnih stanica, kao i citokina ili drugih čimbenika koji sudjeluju u imunološkoj obrani organizma (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

1.3. ANTIOKSIDANSI

1.3.1. Lipidna oksidacija i antioksidansi

Zbog potencijalno velike mogućnosti stvaranja slobodnih radikala organizam je razvio brojne prirodne mehanizme obrane od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih spojeva. Potencijalnu toksičnost tih spojeva u fiziološkim uvjetima sprječava velik broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa.

Antioksidansom se smatra spoj, koji prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, znatno odgađa ili sprječava oksidaciju te tvari. Ovi zaštitni mehanizmi djeluju zajednički, u međusobnoj suradnji, u obliku kaskade.

Mnogobrojne su podjele spojeva s antioksidacijskom aktivnošću. Klasificiraju se prema podrijetlu (endogeni, egzogeni) i mjestu djelovanja (stanični, izvanstanični, membranski), prema topljivosti (u vodi ili lipidima), na enzime i male molekule. Nadalje, dijele se i prema načinu djelovanja na preventivne (sprječavaju nastajanje slobodnih radikala), tzv. Čistače (čiste radikale inhibicijom inicijacije ili prekidanjem propagacije lančane reakcije) te enzime popravka tako da popravljaju nastala oštećenja. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

Lipidna oksidacija glavni je uzrok smanjenja kvalitete hrane i stvaranja neugodnog mirisa i okusa iste, što smanjuje rok trajanja, mijenja teksturu i boju, te smanjuje prehrambene vrijednosti hrane. Jedan od glavnih puteva razgradnje lipida je autooksidacija. Autooksidacija polinezasićenih lipida iz hrane uključuje lančanu reakciju potaknutu slobodnim radikalima, koja se aktivira izlaganjem lipida svjetlu, toplini, ionizirajućem zračenju, metalnim ionima ili katalizatorima metaloproteina. Enzim lipooksigenaza također može inicirati autooksidaciju. Klasičan put autooksidacije uključuje reakcije inicijacije (proizvodnja lipinih slobodnih radikala), propagacije i terminacije (proizvodnja ne-radikalnih spojeva).

Antioksidansi djeluju na različitim razinama u oksidacijskom putu koji uključuje molekule lipida. Mehanizam njihovog djelovanja uključuje mogućnost smanjivanja koncentracije kisika, uklanjanje singletnog kisika, uklanjanje metalnih iona, sprječavanje inicijacijske reakcije uklanjanjem inicijalnih radikala kao što je hidroksilni radikal, ali i poticanje raspadanja primarnih produkata oksidacije na ne-radikalne spojeve i prekid lančane reakcije (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

1.3.2. Fenolni antioksidansi

Fenolni spojevi su uglavnom čistači slobodnih radikala, koji odgađaju ili inhibiraju oksidaciju lipida ili prekidaju terminacijsku reakciju, čime se smanjuje nastajanje hlapljivih razgradnih produkata (npr. aldehida i ketona), koji uzrokuju užeglost (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

1.3.3. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Za određivanje antioksidativne aktivnosti koriste se različite analitičke metode, čiju kategorizaciju i princip rada prikazuje **Tablica 1.** (Pisoschi i Negulescu, 2011).

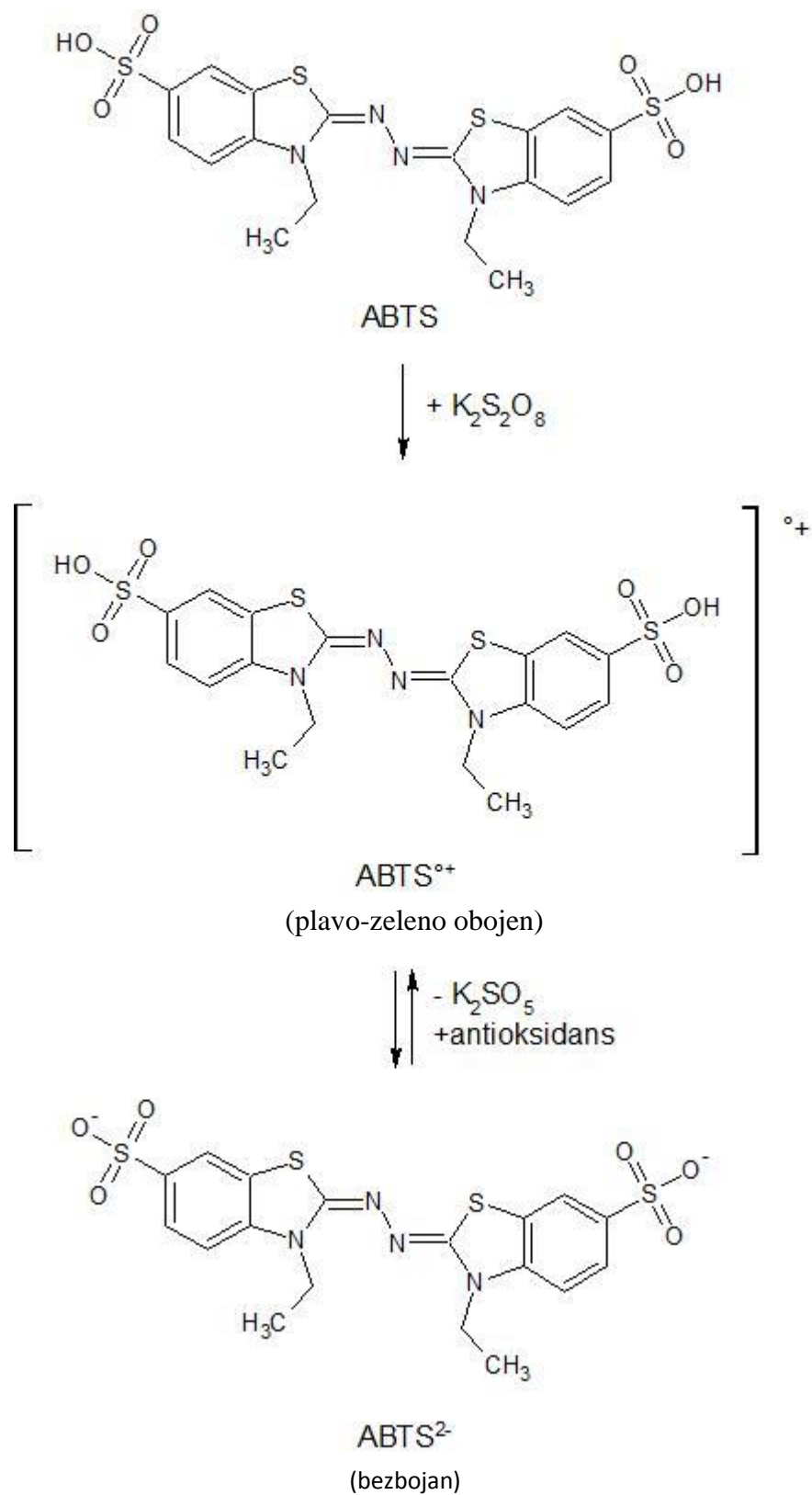
1.3.3.1. ABTS metoda

ABTS metoda analizira sposobnost antioksidansa u uklanjanju stabilnog kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS kation), plavo-zelenog kromofora s maksimumom apsorpcije na 734 nm. U prisutnosti antioksidansa smanjuje se intenzitet obojenja ABTS-a, odnosno dolazi do obezbojenja otopine.

ABTS kation nastaje gubitkom elektronskog para dušika u prisutnosti jakog oksidansa (Shahidi i Zhong, 2015). U tu svrhu najčešće se koristi kalijev persulfat, odnosno rjeđe manganov dioksid (Pisoschi i Negulescu, 2011). Antioksidansi mogu neutralizirati ABTS kation, izravno redukcijom ili prijenosom atoma vodika. Opisani mehanizam prikazan je na **Slici 2.** Ravnoteža između navedena dva mehanizma određena je strukturom antioksidansa i vrijednošću pH medija. Jačina smanjena intenziteta plavo-zelene boje, kvantificirana kao smanjenje apsorbanije, ovisi u duljini trajanja reakcije, intrinzičnoj antioksidativnoj aktivnosti i koncentraciji u uzorku. Dobiveni rezultati izražavaju se kao ekvivalenti Trolox-a, sintetskog u vodi topljivog analoga vitamina E, koji je odabran kao standardni antioksidans (Shahidi i Zhong, 2015).

Tablica 1. Pregled metoda mjerenja antioksidativne aktivnosti u hrani i dodacima prehrani.
(preuzeto iz Pisoschi i Negulescu, 2011)

Vrsta metode	Princip rada	Određivanje završne točke
<i>Spektrofotometrija</i>		
DPPH	Reakcija antioksidansa s organskim radikalom	Kolorimetrija
ABTS	Reakcija antioksidansa s organskim kationskim radikalom	Kolorimetrija
CUPRAC	Redukcija Cu(II) u Cu(I) pomoću antioksidansa	Kolorimetrija
FRAP	Reakcija antioksidansa s Fe(III) kompleksom	Kolorimetrija
PFRAP	Reakcija kalijeva fericijanida s antioksidansom i Fe ²⁺ ionom	Kolorimetrija
ORAC	Reakcija antioksidansa s peroksidnim radikalom	Gubitak fluorescencija fluoresceina
HORAC	Vežanje antioksidansa na OH radikale dobivene iz Co (Fentonova reakcija)	Gubitak fluorescencija fluoresceina
TRAP	Izbacivanje luminol-deriviranih radikala pomoću antioksidansa	Kemiluminiscencijski signal
<i>Elektrokemijske metode</i>		
Ciklička voltametrija	Potencijal radne elektrode pokazuje linearnost od početne do konačne vrijednosti, bilježi se trenutni intenzitet struje	Mjerenje intenziteta katodnog/ anodnog pika
Amperometrija	Potencijal radne elektrode ima fiksnu vrijednost u odnosu na referentnu elektrodu	Mjerenje intenziteta struje
Biamperometrija	Reakcija analita s oksidiranim oblikom redoks para	Mjerenje struje između dvije iste radne elektrode
<i>Kromatografija</i>		
GC	Razdvajanje spojeva iz smjese temeljeno na podjeli između stacionarne faze i plinovite mobilne faze	Detekcija toplinske vodljivosti
HPLC	Razdvajanje spojeva iz smjese temeljeno na podjeli između čvrste stacionarne i mobilne faze, pri velikoj brzini i visokom tlaku mobilne faze	UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska reakcija



Slika 2. Mehanizam oksidacije ABTS-a i reakcija s antioksidansom (prilagođeno iz Shalaby i Shanab, 2013)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje oduvijek je bila važna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva, a zahvaljujući prepoznavanju njegove prehrambene, preventivne i terapijske vrijednosti, danas je maslinovo ulje postalo sinonim zdravog načina prehrane i modernog življenja.

Budući da je ekstra djevičansko maslinovo ulje dobar izvor polifenolnih sastavnica, kojima se pripisuje ključna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju maslinovog ulja na ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je

- (i) procijeniti kvalitetu ispitivanih maslinovih ulja obzirom na sadržaj polifenola,
- (ii) odrediti antioksidativnu aktivnost istih,
- (iii) korelirati sadržaj polifenola maslinovih ulja i njihovu antioksidativnu aktivnost i utvrditi njihovu moguću povezanost te
- (iv) usporediti sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost prikupljenih maslinovih ulja s dostupnim podacima za druga maslinova ulja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka)
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), ABTS, slobodni radikal (Sigma Aldrich, Kanada)
- Kalijev persulfat (Sigma Aldrich, SAD)
- Galna kiselina, certificirani referentni materijal, Trace CERT[®] (Flika Analytical, Švicarska)
- Metanol, ACS-Reag. Ph. Eur.-Reag. USP (Carlo Erba, Italija)
- Natrijev karbonat (Sigma Aldrich, SAD)
- n-heksan, ACS-Reag. Ph. Eur. (Carlo Erba, Italija)
- Trolox (Sigma Aldrich, Švicarska)

3.1.2. Uzorci

- 25 uzoraka maslinovog ulja iz različitih dijelova Republike Hrvatske

3.1.3. Radni instrumenti

- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Centrifuga, Nanofuge (Hofer Scientific Instruments, SAD)
- Kiveta za UV-VIS spektrofotometar 1 cm
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Tresilica Lab Dencer- vortex (Ika- Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)

3.1.5. Programski paketi

- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD)
- ChemSketch (ACD Inc., SAD)

3.2. METODE

Određivanje ukupnih polifenola u maslinovom ulju provedeno je primjenom UV-VIS spektrofotometrije i Folin-Ciocalteu reagensa. Analiti su iz uzorka ekstrahirani primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće. Nakon optimizacije postupka ekstrakcije i određivanja sadržaja, ispitana je antioksidativna aktivnost maslinovog ulja ABTS metodom.

3.2.1 Priprema standardnih otopina

Standardna otopina galne kiseline pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase spoja u 60%-tnom metanolu (60:40, vol/vol), (koncentracija 2 mg/mL).

Nakon toga pripremljen je niz radnih otopine za izradu kalibracijske krivulje galne kiseline, a koncentracije su iznosile: 0,4, 0,8, 2,0, 4,0 i 8,0 µg/mL.

Folin-Ciocalteu reagens pripremljen je razrjeđivanjem s ultračistom vodom u omjeru 1:10. Natrijev karbonat pripremljen je kao 10%-tna otopina u ultračistoj vodi.

Radne otopine za izradu kalibracijske krivulje Trolox-a pripravljene su otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u 75%-tnom metanolu (75:25, vol/vol) (koncentracija 10 mmol/L). Koncentracije radnih otopina Trolox-a iznosile su redom 0,5, 1,5, 1,75, 2,0, 3,0 mmol/L).

Otopina kalijevog persulfata pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u deioniziranoj vodi u tamnoj odmjernoj tikvici klase A ($c=2,45 \cdot 10^{-3}$ mol/L).

ABTS otopina pripravljena je tako da je odgovarajuća masa krute tvari otopljena u prethodno priređenoj otopini kalijeva persulfata i ostavljena na tamnom mjestu kroz 12 h, kako bi se aktivirao slobodni radikal.

3.2.2. Ekstrakcija polifenola metodom tekuće- tekuće

U 2,5 g maslinovog ulja doda se 5 mL *n*-heksana i 3 ml 60%-tnog metanola (60:40, vol/vol). Smjesa se stavi na tresilicu 2 minute nakon čega se uzorci centrifugiraju (3500 rpm; 10 min). Nakon odvajanja faza postupak se ponovi još jednom s heksanskom fazom, dodavanjem 3 mL

60%-tnog metanola (60:40, vol/vol). Na kraju se spoje obje metanolne faze u kojima su ekstrahirane fenolne tvari.

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola primjenom UV-VIS spektrofotometrije

Za određivanje ukupnih fenolnih tvari u odmjernu tikvicu od 5 mL otpipetira se 0,20 mL metanolnog ekstrakta, koji se potom razrijedi ultračistom vodom do 2,5 mL. Nakon toga doda se 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa, a nakon 3 min doda se 0,5 mL otopine natrijeva karbonata. Zatim se smjesa dobro promućka i nadopuni vodom do oznake. Nakon točno dva sata mjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 725 nm. Slijepa proba se izradi prema propisu, pri čemu se umjesto 0,20 mL metanolnog ekstrakta otpipetira isti volumen 60%-tnog metanola (60:40, vol/vol).

Količina ukupnih polifenola odredi se pomoću kalibracijske krivulje standarda, a sadržaj ukupnih polifenola izrazi se kao mg galne kiseline po kg uzorka. Određivanje je provedeno u triplikatu.

3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS metodom

Spektrofotometrijska analiza inhibicije ABTS radikala određena je prema metodi Re i sur. (1999). Ukratko, u Falcon™ epruvetu otpipetira se 30 µL ispitivanog maslinovog ulja i 90 µL *n*-heksana, te dobro promućka i inkubira 10 minuta. Zatim se 25 µL otopljenog maslinovog ulja otpipetira u novu Falcon™ epruvetu, doda 5 mL pripremljene ABTS otopine, te dobro promućka i inkubira na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta pri valnoj duljini 734 nm izmjeri se apsorbancija, uz metanol kao slijepu probu.

Sposobnost „hvatanja“ slobodnog radikala izračunata je kao postotak obezbojenja otopine slobodnog radikala (SR) korištenjem formule 1.

$$\% \text{ inhibicije SR} = \left(1 - \frac{A_{UZ}}{A_0}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je A_{UZ} apsorbancija otopine uzoraka maslinovog ulja nakon dodatka otopine slobodnog radikala, dok je A_0 apsorbancija otopine slobodnog radikala. Svaki uzorak je analiziran u triplikatu.

Antioksidativna aktivnost određena je iz kalibracijske krivulje standarda Trolox-a, a rezultati izraženi kao mmol ekvivalenta Trolox-a/L, odnosno mmol ekvivalenta Trolox-a/kg ulja.

3.2.5. Statistička obrada podataka

U obradi dobivenih podataka za sve je varijable provedena analiza normalnosti raspodjele Kolmogorov-Smironovim testom. Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, dok su ostale varijable prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom, odnosno gornjom granicom prve i treće kvartile (25. i 75. percentila).

Pearsonov koeficijent korelacije i Spearmanov koeficijent korelacije rangova korišteni su kako bi se ispitala razina povezanosti između pojedinih varijabli.

P-vrijednost manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom, dok je p-vrijednost manja od 0.01 uzeta kao statistički visoko značajna za sve korištene analize. Pomoću regresijske analize dobivene su jednadžbe pravca i pripadajući koeficijenti determinacije R^2 .

Za obradu svih eksperimentalnih podataka korišteni su računalni programi Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, SAD) i Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju

Za ekstrakciju polifenolnih tvari iz uzoraka ulja korišten je modificirani postupak prema Fuentes i sur. (2012), a za njihovo određivanje postupak prema Gutfinger-u (Gutfinger, 1981) uz Folin-Ciocalteau reagens (Singleton, 1965).

Navedeni reagens s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene spojeve čiji se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 725 nm. Iako kemijska struktura Folin-Ciocalteau reagensa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da dio strukture čine fosfomolibdenske i fosfovolframske heteropoli kiseline, koje su žute boje. Smatra se da u prisustvu fenola u bazičnom reakcijskom mediju nastaje kompleks Mo-W, koji reakcijsku smjesu oboji u plavo.

Sadržaj ukupnih polifenola u maslinovim uljima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka upotrebom kalibracijske krivulje standarda galne kiseline, te su vrijednosti izražene kao mg galne kiseline po kg uzorka. Za izradu kalibracijske krivulje korištene su sljedeće otopine: galna kiselina (2 mg/mL) u 60%-tnom metanolu, 10%-tna vodena otopina natrijevog karbonata i Folin-Ciocalteau reagens (razrijeđen s ultračistom vodom u omjeru 1:10). Otopine galne kiseline rastućih koncentracija (od 0,4 do 8 µg/mL) priređene su za izradu kalibracijske krivulje (**Tablica 2**).

O ovom radu sakupljeno je 25 uzoraka maslinovog ulja iz različitih područja Republike Hrvatske. Sakupljena ulja podrijetlom su s područja istarskog poluotoka, ali i Dalmacije. U pogledu strukture sorta sakupljena su ulja dobivena od autohtonih sorti poput oblice, istarske bjelice i drobnice, ali i intoduciranih sorti poput leccino, pendolino i drugih.

U istraživanje su uključena maslinova ulja maslinara koji posjeduju maslinike male veličine, te ulja proizvode isključivo za vlastite potrebe, zatim maslinova ulja proizvođača koji imaju obrt registriran za obavljanje poljoprivredne aktivnosti, ali i ulja većih distributera.

Rezultati dobiveni navedenom spektrofotometrijom metodom prikazuju relativno veliku varijabilnost u sadržaju polifenola analiziranih maslinovih ulja (41,36-313,15 mg polifenola/kg maslinovog ulja), dok je srednja vrijednost ukupnih polifenola iznosila 124,81 mg polifenola/kg ulja (**Tablica 3**). Sva mjerenja provedena su u triplikatu, a RSD vrijednosti bile su manje od 10,7%.

Treba istaknuti da su dostupni literaturni podaci o sadržaju polifenola u maslinovim uljima izraženi na različite načine i pri tome korišteni različiti standardi poput galne kiseline

(Bayram i sur., 2012, Žanetić i sur., 2014, Pellegrini i sur., 2001), kavene kiseline (Borges i sur., 2017). Tako su Bayram i sur. (2012) analizirali 55 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja porijeklom iz Italije (10), Španjolske (12), Turske (12), Grčke (7), Francuske (3), Portugala (4), Australije (3), SAD (3) i Južne Afrike (1). Rezultati dobiveni u ovom radu u skladu su sa sadržajem polifenola u prethodno navedenim uzorcima (45–532 mg galne kiseline/kg ulja). Također se može primijetiti da je sadržaj ovih biološki aktivnih sastavnica maslinovih ulja iz različitih zemalja oscilirao u širem intervalu, pri čemu su ulja iz Italije imala najveći sadržaj polifenola.

Osim toga, dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima za talijanska ekstra djevičanska maslinova ulja (Pellegrini i sur., 2001). Pellegrini i sur. analizirali su 6 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja (73–265 mg galne kiseline/kg ulja), 3 maslinova ulja (14–30 mg galne kiseline/kg ulja) prikupljena na tržištu Italije te rafinirano maslinovo ulje (4 mg galne kiseline/kg ulja).

Sadržaj polifenola u maslinovom ulju oscilira ovisno o nizu faktora, poput godini. Tako su Žanetić i sur. (2014) analizirali sadržaj polifenola u maslinovim uljima iz Dalmacije u dvije uzastopne godine. Sadržaj ukupnih polifenola bio je u rasponu od 85,59 mg galne kiseline/kg ulja u prvoj godini do 382,99 mg galne kiseline/kg ulja u drugoj godini.

Gore navedeni rezultati upućuju na to da se radi o izuzetno kvalitetnim maslinovim uljima s područja Republike Hrvatske. Također, potrebno je istaknuti da je nešto veći udio polifenolnih spojeva prisutan u maslinovim uljima proizvođača koji imaju obrt registriran za obavljanje poljoprivredne aktivnosti.

4.2. Procjena antioksidativne aktivnosti maslinovog ulja

Za određivanje antioksidativne aktivnosti različitih uzoraka maslinovog ulja korišten je modificirani postupak prema Fiorini i sur. (2018).

Ukratko, primjenjivani test temelji se na sposobnosti antioksidansa u gašenju ABTS kationa, plavo-zelenog kromofora, koji apsorbira na valnoj duljini od 734 nm. Smanjenje vrijednosti apsorbancija proporcionalno je količini antioksidansa prisutnih u analiziranom ulju.

Ukupna antioksidativna aktivnost maslinovog ulja određena je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći kalibracijsku krivulju standarda Trolox-a, te su vrijednosti

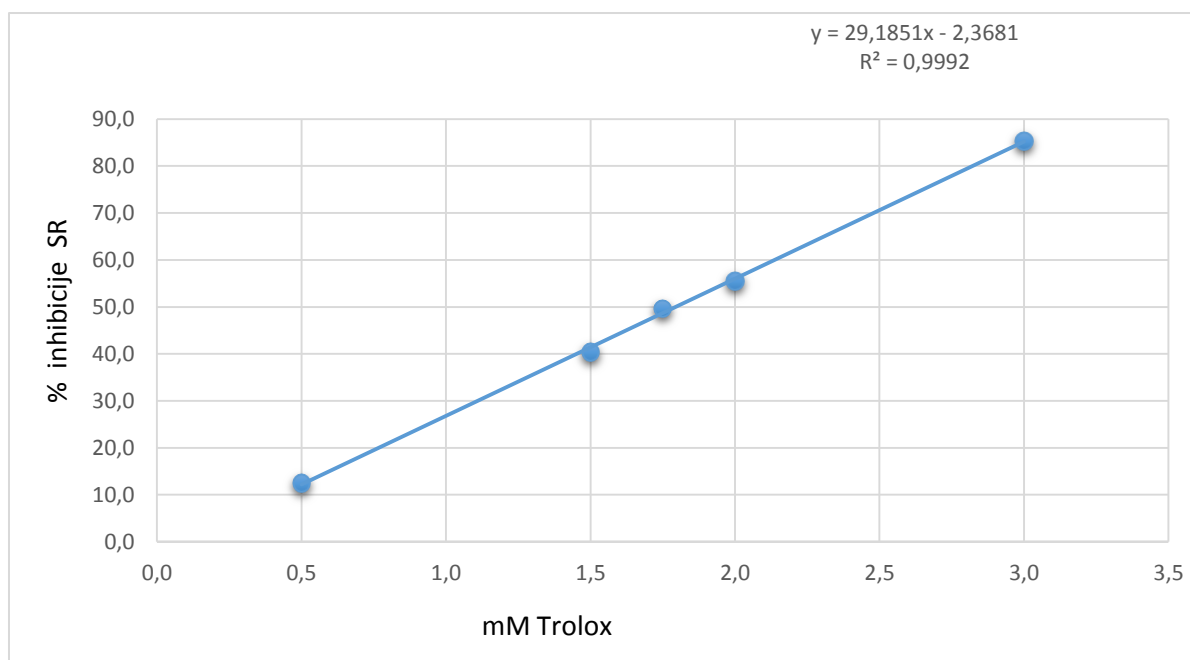
prikazane kao koncentracije Trolox-a izražene u mM. Za izradu kalibracijske krivulje korištene su radne otopine Trolox-a rastućih koncentracija (od 0,5 do 3,0 mM) (**Slika 3**). Na **Slici 4**. prikazana je dobivena kalibracijska krivulja, te vrijednost koeficijenta korelacije ($R^2=0,9992$), koja upućuje na zadovoljavajuću linearnost metode.

Tablica 2. Radno područje i kalibracijska krivulja primijenjenih UV-VIS metoda za određivanje koncentracije ukupnih polifenola te procjenu antioksidativne aktivnosti maslinovih ulja ABTS testom.

	λ_{kvant} (nm)	Radno područje	Kalibracijska krivulja (n=5)	Koeficijent korelacije
Ukupni polifenoli (μg galne kiseline/mL)	725	0,4 – 8	$y = 0,0736x + 0,0372$	0,9733
ABTS test (mM Trolox)	734	0,5 – 3	$y = 29,1851x - 2,3681$	0,9992



Slika 3. Radne otopine za izradu kalibracijske krivulja Trolox-a.



Slika 4. Kalibracijska krivulja standarda Trolox-a dobivena spektrofotometrijskom metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti (ABTS metoda). % inhibicije SR izračunat je prema formuli 1. SR- slobodni radikal.

U istraživanje je uključeno svih 25 uzoraka maslinovog ulja kojima je prethodno određen sadržaj ukupnih polifenola, što je opisano u poglavlju 4.1.

Dobiveni rezultati ukazuju na varijabilnost antioksidativne aktivnosti pojedinih uzoraka maslinovih ulja ovisno o ukupnom sadržaju polifenola. Koncentracije dobivene primjenom ABTS metode kreću se u rasponu od 0,47 mM do 2,40 mM Trolox-a (**Tablica 3**), pri čemu su sva mjerenja provedena u triplicatu, te su RSD vrijednosti bile do 3,0%.

Usporedbu rezultata ovog rada s onim dobivenim od strane drugih autora korištenjem ABTS metode dosta je teško izvršiti zbog razlika u pripremi uzoraka za analizu i načinu izražavanja rezultata. Tako su pri izražavanju rezultata antioksidativne aktivnosti neki autori koristili mmol Trolox/L, odnosno mmol Trolox/kg ulja, dok su drugi svoje rezultate prikazali u obliku IC_{50%} ili EC_{50%} vrijednosti, koja se može definirati kao koncentracija maslinovog ulja potrebna za 50% smanjene početne vrijednosti ABTS slobodnog radikala.

Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost u analiziranim maslinovim uljima.

Parametar	SV	Medijan	Raspon kvantificiranih vrijednosti	Interkvartil
Ukupni polifenoli (mg galne kiseline / kg ulja)	136,07	102,08	41,36-313,15	87,17-179,56
Antioksidativna aktivnost (mM Trolox)	1,10	0,88	0,47-2,40	0,74-1,26
Antioksidativna aktivnost (mM Trolox / kg ulja)	1,23	0,95	0,47-2,67	0,81-1,47

Legenda: SV – srednja vrijednost tri mjerenja

Borges i sur. (2017) analizirali su 33 uzorka ekstra djevičanskog maslinovog ulja iz 11 različitih geografskih područja (n=3 iz svake oblasti) Španjolske (9 oblasti) i Brazila (2 oblasti). Srednje vrijednosti antioksidativne aktivnosti navedenog istraživanja (0,33 do 0,56 mmola Trolox/kg ulja iz Brazila; 0,20 do 0,73 mmola Trolox/kg ulja iz Španjolske) bile su niže nego vrijednosti dobivene u ovom istraživanju.

Antioksidativna aktivnost 55 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja iz 9 različitih zemalja kretala se u rasponu 0,11-1,01 mmola Trolox/kg ulja (Bayram i sur., 2012), dok su Žanetić i sur. (2014) analiziranjem maslinovih ulja iz Dalmacije u dvije uzastopne godine procijenili antioksidativnu aktivnostu od 1,14 do 1,33 mmol Trolox /kg ulja.

Rezultati ovog rada u skladu su s rezultatima dobivenim za ekstra djevičanska maslinova ulja (1,53 do 2,69 mmol Trolox/kg ulja) te maslinova ulja (0,72–1,06 mmol Trolox/kg ulja) dostupna na tržištu Italije (Pellegrini i sur., 2001).

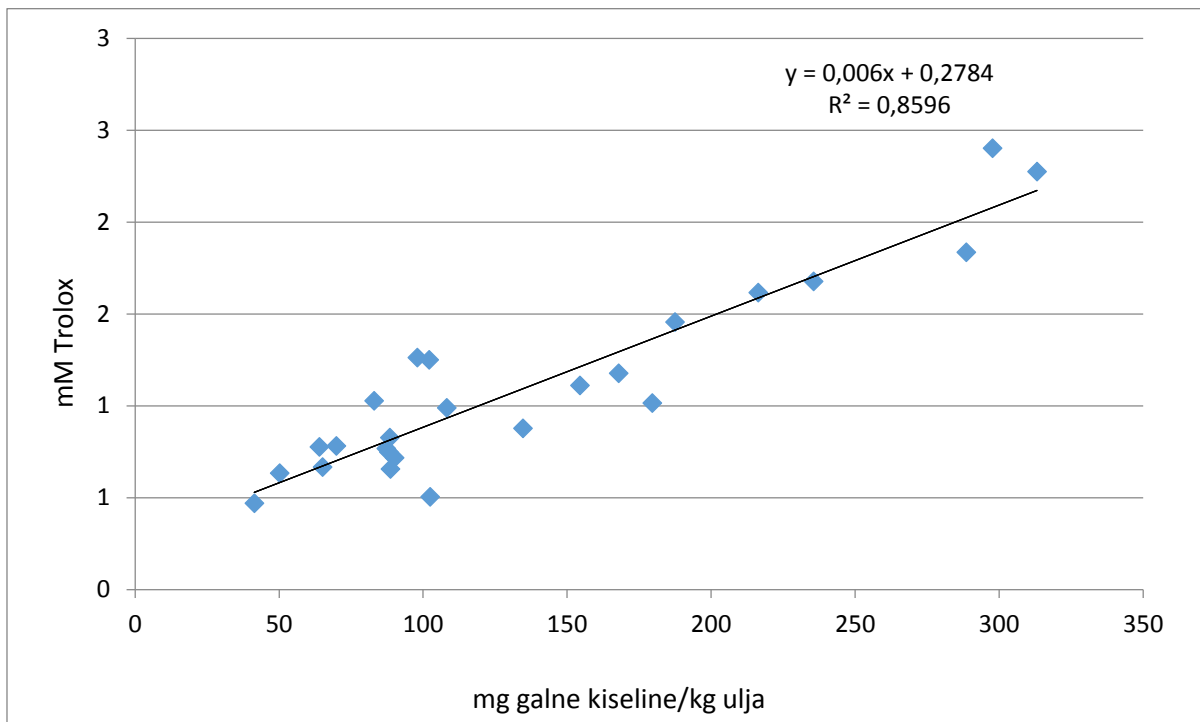
Nadalje, Samaniego Sanchez i sur. (2007) proveli su istraživanje na 39 uzoraka ekstra djevičanskog maslinovog ulja, odnosno 13 uzoraka iz 3 godine, dok je 6 maslinovih ulja korišteno za usporedbu. Antioksidativna aktivnost bila je u uskom intervalu od 0,56 do 1,00 mmol Trolox/L.

Zanimljivo je naglasiti da su rezultati provedene statističke analize pokazali statistički značajnu korelaciju (Spearmanov koeficijent korelacije $r=0.8612$ i $p<0.000001$; Pearsonov koeficijent korelacije $r=0.9271$ i $p<0.000001$) između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti u analiziranim maslinovim uljima.

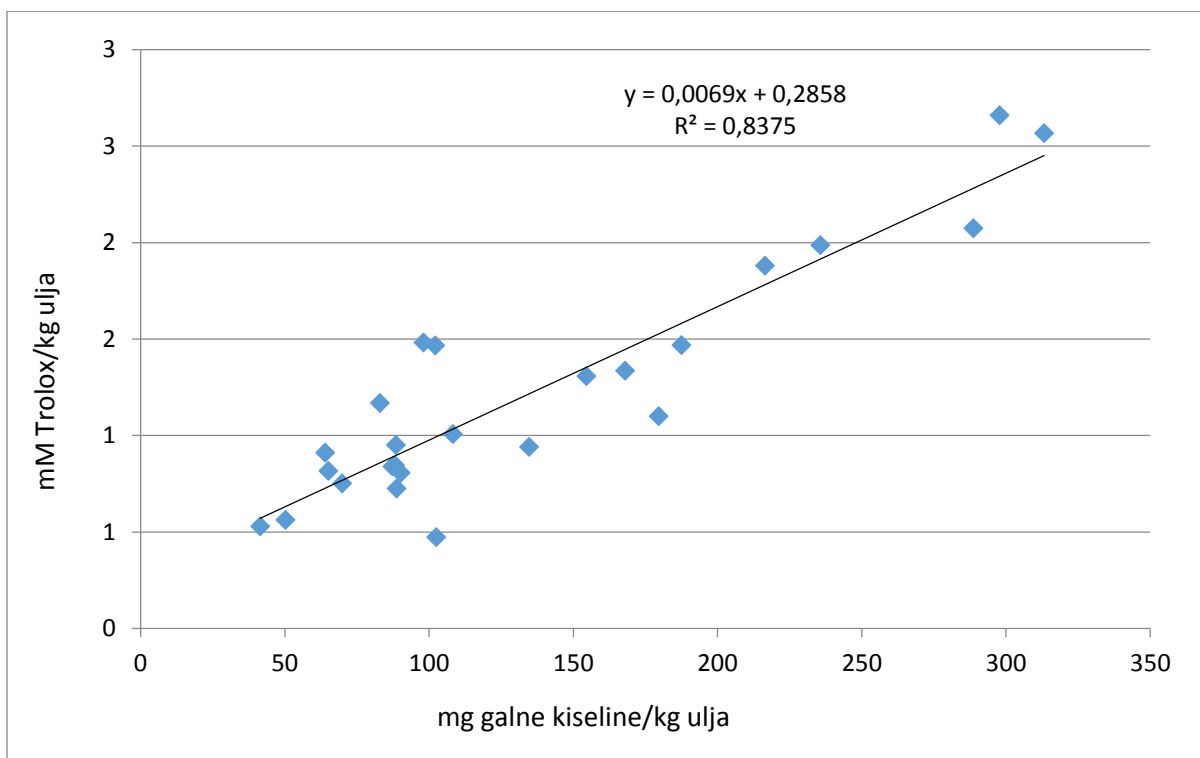
U grčkim maslinovim uljima (n=50 uzoraka) korelacija između ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti procijenjene ABTS testa iznosila je od 0,52 do 0,90 ovisno o vrsti ulja (Miniotti i Georgiou, 2010), dok je u 55 uzoraka ulja iz 9 različitih zemalja (Bayram i sur., 2012) utvrđena statistički visoko značajna korelacija (Spearmanov koeficijent korelacije $r=0,95$ i $p<0,001$). U dostupnoj literaturi nalaze se podaci povezanosti sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti kroz niz godina (Samaniego Sanchez i sur., 2007). Tako je na uzorcima (n=39) prikupljenim kroz 3 godine (svaka godina 13 uzoraka) utvrđena prosječna korelacija $R^2=0,8927$. Kada se rezultati u ovog istraživanja prikazani na **Slici 5** ($R^2=0,8596$) usporede s vrijednostima u tri godine navedenog istraživanja, najveća usklađenost je u prvoj godini ($R^2=0,8586$).

Na temelju rezultata ovog istraživanja, znatna količina polifenola nalazi se u hrvatskim maslinovim uljima, dok je antioksidativna aktivnost ove važne namirnice u skladu s koncentracijama ovih bioaktivnih fitokemikalija.

(a)



(b)



Slika 5. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti analiziranih maslinovih ulja izražena u (a) mM Trolox-a, odnosno (b) mM Trolox-a/kg ulja.

5. ZAKLJUČAK

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Analizirana maslinova ulja mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica te upućuju na iznimnu kvalitetu ovih ulja s područja Republike Hrvatske.
2. Antioksidativna aktivnost ispitivanih maslinovih ulja u skladu je s sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica.
3. Obje korištene metode su brze i iznimno ponovljive te prikladne za rutinske analize maslinovog ulja.
4. Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti i pojedinih sastavnica polifenola primjenom drugih metoda.
5. Također je u istraživanje potrebno uključiti i maslinova ulja dobivena od drugih sorti maslina kroz niz godina.

6. LITERATURA

- Bayram B, Esatbeyoglu T, Schulze N, Ozcelik B, Frank J, Rimbach G. Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012, 326-336.
- Borges TH, Lopez LC, Pereira JA, Cabrera-Vique C, Seiquer I. Comparative analysis of minor bioactive constituents (CoQ10, tocopherols and phenolic compounds) in Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain. *J Food Compost Anal*, 2017, 47-54.
- Borges TH, Pereira JA, Cabrera-Vique C, Seiquer I. Study of the antioxidant potential of Argentina extra virgin olive oils from Brazil and Spain applying combined models of simulated digestion and cell culture markers. *J Funct Foods*, 2017, 209-218.
- Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinka biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 642-643.
- D'Antuono I, Bruno A, Linsalata V, Minervini F, Garbetta A, Tufariello M, Mita G, Logrieco AF, Bleve G, Cardinali A. Fermented Apulian table olives: effect of selected microbial starters on polyphenols composition, antioxidant activities and bioaccessibility. *Food Chem*, 2018, 137-145.
- Domac R. Flora Hrvatske. Priručnik za određivanje bilja. II izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2002, str. 351.
- Fiorini D, Boarelli MC, Conti P, Alfei B, Caprioli G, Ricciutelli M, Sagratini G, Fedeli D, Gabbrianelli R, Pacetti D. Chemical and sensory differences between high price and low price extra virgin olive oils. *Food Res Int*, 2018, 65-75.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1981, 966-968.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Gammazza AM, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci*, 2018, 19, 1-13.
- Keys A, Aravanis C, van Cuchem FSP, et al. The diet and all-causes death rate in the Seven Countries Study. *Lancet*, 1981, 58-61.
- Miniotti KS, Georgiou CA. Comparison of different test used in mapping the Greek virgin olive oils production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Y Aceites*, 2010, 61, 45-51.

Pellegrini N, Visioli F, Buratti S, Brighenti F. Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 2532–2538.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*, 2006, 17, 429-445.

Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A review. *Biochem & Anal Biochem*, 2011, 1:106.

Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, 2009, Zagreb, Narodne novine, broj 7 (NN/7/09).

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Radic Biol Med*, 1999, 1231-1237.

Samaniego Sánchez C, Troncoso González AM, García-Parrilla MC, Quesada Granados JJ, López García de la Serrana H, López Martínez MC. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta*, 2007, 12, 103-107.

Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *J Funct Foods*, 2015, 18, 820-897.

Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, 2015, 757-781.

Shalaby EA, Shanab SMM. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2013, 528-539.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *AM J Enol Viticult*, 1965, 13, 144-158.

Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barberić A. Ukupne fenolne tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima. *Pulmologia Croatica*, 2007, 13, 17-30.

Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr*, 2004, 955-965.

Vodič kroz masline-1. dio, 2012., <https://dignano.wordpress.com/2012/12/04/vodic-kroz-masline-1-dio/>, pristupljeno 10. 07. 2018.

Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pulmologia Croatica*, 2006, 12, 159-173.

Žanetića M, Cerretanib L, Del Carloc M, Jukić Špika M. Phenolic profile and antioxidant activity of virgin olive oil from cv. Drobница. 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Opatija, 2014. https://www.researchgate.net/publication/316787538_Phenolic_profile_and_antioxidant_activity_of_virgin_olive_oil_from_cv_Drobница, pristupljeno 10. 07. 2018.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Maslinovo ulje oduvijek je bila važna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva. Danas je maslinovo ulje postalo sinonim zdravog načina prehrane i modernog življenja. Budući da je maslinovo ulje dobar izvor polifenolnih sastavnica, kojima se pripisuje važna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju ove namirnice na ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja obzirom na sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim maslinovim uljima određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, dok je antioksidativna aktivnost procijenjena ABTS testom. Rezultati istraživanja upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja te se analizirana maslinova ulja mogu smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica, dok je antioksidativna aktivnost ispitivanih maslinovih ulja u skladu sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica.

Olive oil has always been an important grocery in the daily nutrition of the mediterranean population. Today olive oil has become a synonym of healthy eating habits and a modern living. Olive oil is a good source of polyphenolic components, which take an important role in the preventive and therapeutic function of this food affecting human health. The purpose of this diploma thesis is to evaluate the quality of Croatian olive oils regarding the proportion of polyphenol and to determine their antioxidant activity. The total content of polyphenols in the analyzed olive oils was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant activity was estimated by the ABTS test. The results of the research point to the exceptional quality of Croatian olive oils and that the analyzed olive oils can be considered as a good source of polyphenolic components while the antioxidant activity of the examined olive oils complies with the content of these biologically active constituents.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti hrvatskih maslinovih ulja

Danijela Butković

SAŽETAK

Maslinovo ulje oduvijek je bila važna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva. Danas je maslinovo ulje postalo sinonim zdravog načina prehrane i modernog življenja. Budući da je maslinovo ulje dobar izvor polifenolnih sastavnica, kojima se pripisuje važna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju ove namirnice na ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja obzirom na sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim maslinovim uljima određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, dok je antioksidativna aktivnost procijenjena ABTS testom. Rezultati istraživanja upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja te se analizirana maslinova ulja mogu smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica, dok je antioksidativna aktivnost ispitivanih maslinovih ulja u skladu sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 5 grafičkih prikaza, 3 tablice i 26 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: maslinovo ulje, polifenoli, antioksidativna aktivnost

Mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Anita Hafner, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Spectrophotometric determination of total polyphenol content and antioxidant activity of Croatian olive oil

Danijela Butković

SUMMARY

Olive oil has always been an important grocery in the daily nutrition of the mediterranean population. Today olive oil has become a synonym of healthy eating habits and a modern living. Olive oil is a good source of polyphenolic components, which take an important role in the preventive and therapeutic function of this food affecting human health. The purpose of this diploma thesis is to evaluate the quality of Croatian olive oils regarding the proportion of polyphenol and to determine their antioxidant activity. The total content of polyphenols in the analyzed olive oils was determined by spectrophotometric method using Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant activity was estimated by the ABTS test. The results of the research point to the exceptional quality of Croatian olive oils and that the analyzed olive oils can be considered as a good source of polyphenolic components while the antioxidant activity of the examined olive oils complies with the content of these biologically active constituents.

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

Thesis includes: 39 pages, 5 figures, 3 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive oil, polyphenol, antioxidant activity

Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Research Associate*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Research Associate*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Hafner, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.