

Maslinovo ulje - sastav i biološka aktivnost fenolnih spojeva

Pejović, Jasminka; Barbarić, Monika; Jakobušić Brala, Cvijeta

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2014, 70, 69 - 86**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:977999>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

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



Maslinovo ulje – sastav i biološka aktivnost fenolnih spojeva

JASMINKA PEJOVIĆ¹, MONIKA BARBARIĆ¹, CVIJETA JAKOBUŠIĆ BRALA²

Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

¹Zavod za farmaceutsku kemiju, ²Zavod za fizikalnu kemiju

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

UVOD

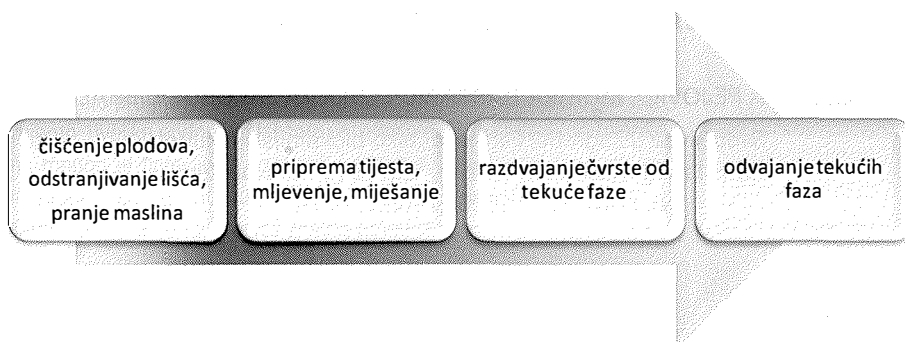
Poznato je da mediteransko stanovništvo, za razliku od drugih, rjeđe obolijeva od kroničnih upalnih bolesti (npr., kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti) i nekih tumora, a životni vijek im je duži zahvaljujući prehrani bogatoj maslinovim uljem, povrćem, voćem i ribom (1). U tzv. mediteranskoj prehrani maslinovo ulje je glavni izvor masnoća, a unos 25–50 mL ekstra djevičanskog maslinovog ulja na dan je dovoljan da bi se ostvario pozitivan blagotvoran učinak na zdravlje što potvrđuje i sve veći broj epidemioloških i eksperimentalnih istraživanja. Zdrava svojstva maslinovog ulja često su se pripisivala visokom udjelu mononezasićenih masnih kiselina. No, u posljednjih desetak godina, istraživanja ističu bogatstvo fenolnih spojeva u maslinovom ulju koji, osim što djeluju kao prirodni antioksidansi, posjeduju određena farmakološka svojstva.

Opće karakteristike masline

Maslina, *Olea europaea* L., spada u porodicu Oleaceae (2) i jedino je jestivo voće iz te porodice (3). Plod je ovalnog oblika tamnozeleno do crne boje i sadrži do 70 % tzv. vegetativne vode, oko 1,6 % proteina, 22 % ulja, 19 % ugljikohidrata, 5,8 % celuloze i 1,5 % minerala. Ostali važni sastojci su pektini, organske kiseline, pigmenti i fenolni spojevi (4). Ulje se nalazi najvećim dijelom u vakuolama stanica mezokarpa (mesnati središnji dio ploda prožet celulozom) ili razasuto po citoplazmi u obliku malih lipidnih inkluzija (5).

Stablo masline je vrlo otporno na nepovoljne uvjete, ali i vrlo zahtjevna kultura ako želimo dobiti kvalitetan i obilan prinos. Kemijski sastav maslinovog ulja, organoleptička svojstva, prehrambena i tržišna vrijednost prvenstveno ovise o čimbenicima koji prate uzgoj, odnosno berbu i čuvanje maslina do proizvodnje ulja. Stoga su za potpun razvoj stabla potrebni pogodan okoliš i pravilna njega (navodnjavanje, obrezivanje, kontrola berbe, prehrana, oprašivači, zaštita od nametnika i bolesti) (5).

Osim agrotehničkih mjera, na kvalitetu maslinovog ulja i njegov sastav a time i farmakološki učinak, svakako utječe i sorta maslina (genetska predodređenost), stupanj dozrijevanja ploda, transport i čuvanje, ali i tehnološki postupci prerade maslina i skladištenje ulja (6). Prerada maslina sastoji se od nekoliko glavnih postupaka prikazanih na slici 1.



Slika 1. Procesne faze prerade plodova masline (5)

U Republici Hrvatskoj Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donijelo je Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina kojim se razlikuje nekoliko kategorija ulja od ploda i komine maslina i to prema sadržaju slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i ostalim svojstvima koja su određena Pravilnikom (7). Prema navedenom razlikujemo:

- djevičanska maslinova ulja (ekstra djevičansko maslinovo ulje; sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina, djevičansko maslinovo ulje; sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina),
- maslinovo ulje lampante; ulje neprihvatljivih senzorskih svojstava, koje sadrži više od 2 grama slobodnih masnih kiselina,
- rafinirano maslinovo ulje; ulje dobiveno rafinacijom djevičanskog maslinovog ulja, koji ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina,
- maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja; ne sadrži više od 1 grama slobodnih masnih kiselina,
- sirovo ulje komine maslina; 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,
- rafinirano ulje komine maslina; ulje dobiveno rafinacijom sirovog ulja komine maslina, koje ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina,
- ulje komine maslina; 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.

Na tržište se radi prodaje krajnjem potrošaču mogu stavljati samo: ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko maslinovo ulje, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja i ulje komine maslina.

U Europskoj farmakopeji navedeno je djevičansko maslinovo ulje (*Olive oil, virgin*) koje se dobiva hladnim prešanjem ili drugim mehaničkim postupcima obrade zrelih plodova masline *O. europaea*. Osim djevičanskog maslinovog ulja Europska farmakopeja propisuje i rafinirano maslinovo ulje (*Olive oil, refined*) koje se dobiva pročišćavanjem maslinovog ulja dobivenog hladnim prešanjem ili drugim mehaničkim postupcima obrade zrelih plodova masline *O. europaea*. Navedeno ulje može se koristiti u proizvodnji i u pripravi parenteralnih pripravaka pri čemu ga je potrebno čuvati ispod inertnog plina. Postoji i mogućnost dodatka pogodnih antioksidansa. Za navedene vrste maslinovog ulja propisana su određena svojstva te ispitivanja, poput udjela slobodnih masnih kiselina, peroksidnog broja, neosapunjivog dijela, sterola, vode i dr. (8–10).

Sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje (slika 2.) sastoji se od glicerolne frakcije ili osapunjivog dijela (90–99 %) i ne-glicerolne frakcije ili neosapunjivog dijela (0,4–5 %) (1, 11, 12). Osapunjivi dio čine uglavnom trigliceridi i slobodne masne kiseline, a neosapunjivi dio čini preko dvjesto spojeva različitih struktura, poput alifatskih i triterpenskih alkohola, ugljikovodika, sterola, hlapljivih spojeva, karotenoida, fenolnih spojeva i dr. Po sadržaju i vrsti spojeva maslinovo ulje se razlikuje od ostalih jestivih ulja, a neki od spojeva pridonose jedinstvenom karakteru i biološkom učinku ulja (3, 5, 13).



Slika 2. Maslinovo ulje (14)

Osapunjivi dio maslinovog ulja

Masne kiseline prisutne u maslinovom ulju uglavnom, do 95 %, vezane su za glicerol u obliku triglicerida. Sastav triglicerida u maslinovom ulju varira obzirom na podrijetlo ulja.

Hidrolizom (lipolizom) triglicerida oslobađaju se masne kiseline, a posljedica je povećanje kiselosti i pad kvalitete ulja (6). Udio slobodnih masnih kiselina u ulju (kiselost) direktni je pokazatelj kvalitete ulja, a ujedno odražava njegu masline od cvijeta do ploda, njegovu preradu, skladištenje te utječe na prodaju i konzumaciju (15). U maslinovom ulju nalaze se masne kiseline s 12 do 24 ugljikova atoma. Najveći udio čine masne kiseline s 16 i 18 ugljikovih atoma koje mogu biti zasićene ili različitog stupnja nezasićenosti u *cis* konformaciji (13). Oleinska kiselina je najzastupljenija nezasićena masna kiselina (55–83 %). Lako je probavljiva i ima visoku biološku vrijednost. U gliceridima, osim oleinske, od jednostruko nezasićenih masnih kiselina prisutne su i palmitoleinska i eikozanoinska kiselina. Esencijalne masne kiseline, linolna (dvostruko nezasićena, ω -6) i α -linolenska (trostruko nezasićena, ω -3) pridonose boljoj kvaliteti ulja (3, 13).

Iako maslinovo ulje sadrži iste masne kiseline kao i druga ulja i masti, upravo ga omjer različitih masnih kiselina čini jedinstvenim i vrijednijim od drugih (tablica 1). Tako, omjer u kojem se linolna i linolenska kiselina nalaze u maslinovom ulju odgovara omjeru tih kiselina u majčinom mlijeku pa se korištenje maslinovog ulja preporuča već u dojenačkoj prehrani (13). Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina veći je nego polinezasićenih što ulje čini otpornijim na oksidaciju (16).

Tablica 1. Udio masnih kiselina u maslinovom ulju (5)

NAZIV MASNE KISELINE		udio (%)
miristinska	C14:0	<0,05
palmitinska	C16:0	7,5–20,0
palmitoleinska	C16:1	0,3–3,5
heptadekanska	C17:0	<0,3
heptadekanoinska	C17:1	<–0,3
stearinska	C18:0	0,5–5,0
oleinska (ω -9)	C18:1	55,0–83,0
linolna (ω -6)	C18:2	3,5–21,0
α -linolenska (ω -3)	C18:3	<1,0
arahidonska	C20:0	<0,6
eikozanoinska	C20:1	<0,4
behenska	C22:0	<0,2
lignocerinska	C24:0	<0,2

Neosapunjivi dio maslinovog ulja

Sastavnice neosapunjivog dijela maslinovog ulja mogu biti lipofilne (topljive u uljnoj frakciji dobivenoj postupkom prerade) ili hidrofilne (topljive u vegetabilnoj vodi dobivenoj postupkom prerade) (4).

Lipofilni spojevi

Približno 60 % neosapunjivog dijela maslinovog ulja čine ugljikovodici. Najzastupljeniji su skvalen i β -karoten (pigmenti) dok ostale čine zasićeni alifatski ugljikovodici i produkti neoformacija podrijetlom iz sterola (dienski ugljikovodici), diterpeni i triterpeni, izoprenoidi te *n*-parafini. Smatra se da skvalen djeluje kemoprotektivno na neke vrste raka, a njegov sadržaj ovisi o procesu ekstrakcije i znatno se smanjuje procesom rafiniranja ulja (5, 13).

Alifatski alkoholi u maslinovom ulju mogu biti u slobodnom obliku ili esterificirani (13). Uglavnom se radi o dugolančanim zasićenim alkoholima s 18 do 30 ugljikovih atoma a sadržaj ovisi o kultivaru, vegetacijskoj godini, zrelosti voća i preradi (3). U frakciji alifatskih alkohola nalaze se i dva aciklička diterpenoida, fitol i geranilgeraniol te triterpenski alkoholi poput eritrodiola i uvaola (5).

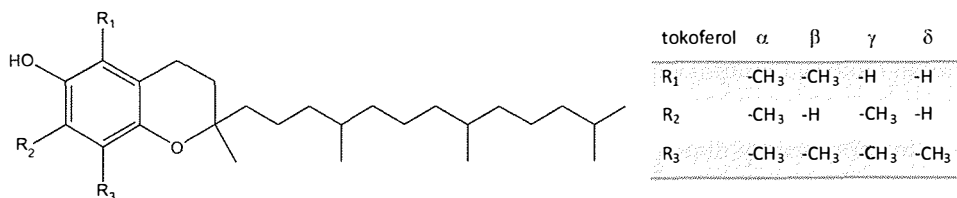
Hidroksipentacikličke triterpenske kiseline, poput oleanolne i maslinske kiseline, iako su prisutne samo u tragovima važni su sastojci maslinovog ulja (5).

Steroli, kao sastavni dio neosapunjivog dijela, spadaju u tetracikličke spojeve nastale biosintezom iz skvalena. Steroli imaju ulogu prirodnih antioksidansa i inhibiraju proces kvarenja ulja, a skladištenjem se njihov sadržaj smanjuje (3, 13).

Pigmenti klorofil i karotenoid daju karakterističnu boju maslinovom ulju. Na količinu pigmenata, a time i na boju ulja utječu sorta, stupanj sazrijevanja, proizvodni proces i uvjeti skladištenja.

Najvažniji lipofilni fenoli u maslinovom ulju su tokoferoli i tokotrienoli. Tokoferoli imaju prirodno antioksidacijsko djelovanje i inhibiraju autooksidacijsko kvarenje ulja (vezanje kisika iz zraka na nezasićene veze u lancu masne kiseline). Sadržaj tokoferola u ulju iznosi 150–330 mg/kg (3, 13).

Najzastupljeniji tokoferol u maslinovom ulju je α -tokoferol ili vitamin E (90 % svih tokoferola), a uz njega prisutni su β , γ i δ oblici (slika 3.) (5, 13). Samo jedna žlica maslinovog ulja sadrži 8 % preporučenih dnevnih količina vitamina E (17).

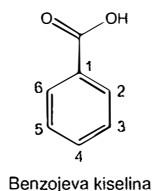


Slika 3. Struktura tokoferola i njegovih derivata

Hidrofilni spojevi

Hidrofilni fenolni spojevi iz maslinovog ulja složena su smjesa spojeva raznolike kemijske strukture (fenolne kiseline, fenolni alkoholi, hidroksiizokromani, flavonoidi i dr.) zaslužni za većinu antioksidativnih svojstava maslinovog ulja (3). Potvrđeno je i sinergističko djelovanje hidrofilnih fenola i α -tokoferola na stabilnost djevičanskog maslinovog ulja (13). Fenolni spojevi se tijekom prerade ulja u količini i do 80 % nepovratno gube s vegetabilnom vodom u postupku prerade (13, 18). Većina fenolnih spojeva je ambifilna; raspodjeljuje se između lipidne (maslinovo ulje) i vodene faze (vegetabilna voda) (19). Prisutnost fenola u ekstra djevičanskom maslinovom ulju i njihov sadržaj (0,02–1000 mg/kg) ovisi o brojnim faktorima: sorti masline, zemljopisnoj regiji, agrotehničkim mjerama, zrelosti ploda kod berbe, ekstrakciji i preradi maslinovog ulja, skladištenju i načinu uporabe (konzumaciji) (1, 5, 6, 11).

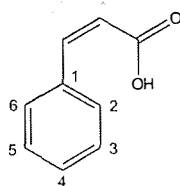
Fenolne kiseline, kao aromatski sekundarni metaboliti, sveprisutne su kod biljaka. U maslinovom ulju razlikujemo dva tipa fenolnih kiselina; derivate benzojeve kiseline (slika 4.) i derivate cimetine kiseline (slika 5.). Osim navedenih derivata u maslinovom ulju mogu biti prisutne i druge fenolne kiseline poput derivata fenilacetene kiseline (slika 6.) (20).



Benzojeva kiselina

naziv spoja	R
3-hidroksibenzojeva kiselina	3-OH
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	4-OH
3,4-dihidroksibenzojeva kiselina	3,4-OH
gentizinska kiselina	2,5-OH
vanilinska kiselina	3-OCH ₃ , 4-OH
galna kiselina	3,4,5-OH
siringična kiselina	3,5-OCH ₃ , 4-OH

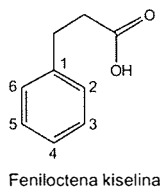
Slika 4. Benzojeva kiselina i njezini derivati



Cimetna kiselina

naziv spoja	R
<i>o</i> -kumarna kiselina	2-OH
<i>p</i> -kumarna kiselina	4-OH
kavena kiselina	3,4-OH
ferulična kiselina	3-OCH ₃ , 4-OH
sinapna kiselina	3,5-OCH ₃ , 4-OH

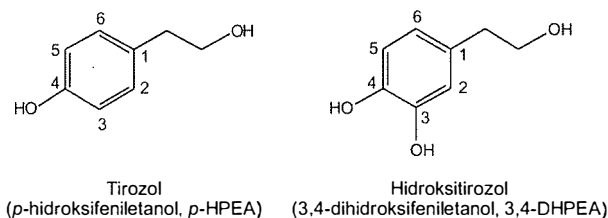
Slika 5. Cimetna kiselina i njezini derivati



naziv spoja	R
<i>p</i> -hidroksifeniloctena kiselina	4-OH
3,4-dihidroksifeniloctena kiselina	3,4-OH
4-hidroksi-3-metoksifeniloctena kiselina	3-OCH ₃ , 4-OH

Slika 6. Feniloctena kiselina i njezini derivati

Od fenolnih alkohola prisutnih u maslinovom ulju najzastupljeniji su tirozol (4-hidroksifeniletanol, *p*-HPEA) i hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol, 3,4-DHPEA) (slika 7.) (12).

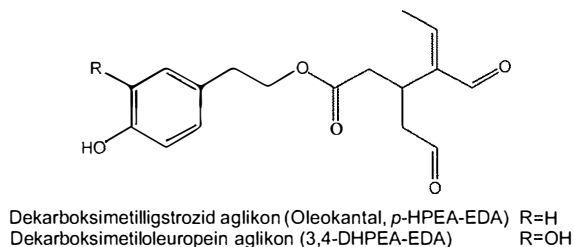
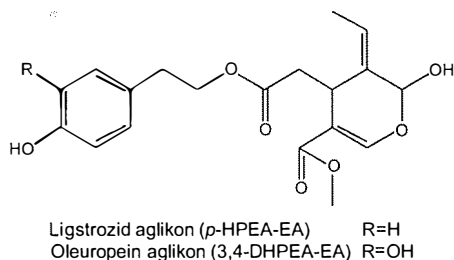
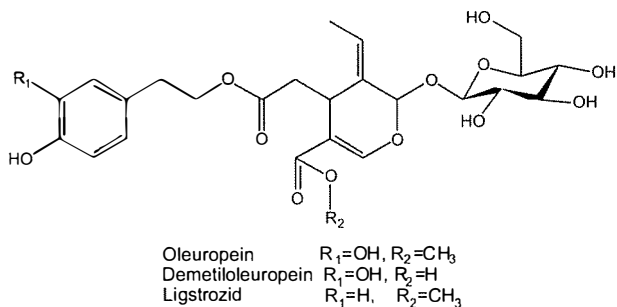


Slika 7. Strukture tirozola i hidroksitirozola

Tirozol i hidroksitirozol mogu biti prisutni u slobodnom ili esterificiranom obliku. Esterificirani su najčešće s elenolnom kiselinom (EA) na koju se može vezati glukoza pri čemu nastaje glukozid, odnosno spojevi koji se nazivaju sekoiridoidi (12). Ligstrozid, odnosno, oleuropein čini tirozol, odnosno, hidroksitirozol, esterificiran s EA na koju je vezana glukoza. Aglikoni ligstrozida, odnosno oleuropeina nastaju odcjepljivanjem glukoze. Najobilniji sekoiridoidi u ekstra djevičanskom maslinovom ulju su oleokantal (*p*-HPEA-EDA, tirozol vezan za dialdehidni oblik elenolne kiseline) i 3,4-DHPEA-EDA (hidroksitirozol vezan za dialdehidni oblik elenolne kiseline) kao i 3,4-DHPEA-EA (oleuropein aglikon) (slika 8.) (20).

Tirozol i hidroksitirozol zajedno sa svojim sekoiridoidnim derivatima čine gotovo 90 % ukupnih fenola u ekstra djevičanskom maslinovom ulju, ali zbog svojih polarnih skupina skoro 80 % se gubi tijekom procesa rafiniranja. Aglikonski dio u strukturi oslobađa se tijekom drobljenja i mljevenja plodova pod utjecajem endogene β -glukozidaze. Tijekom skladištenja ulja zbog hidrolize raste koncentracija oslobođenog tirozola i hidroksitirozola (21). Prisutnost fenolnih spojeva, a posebice dekarboksimetiloleuropein aglikona, pridonosi karakterističnom pikantnom i gorkom okusu ulja (5).

Od ostalih spojeva u maslinovom ulju kao dio fenolnih spojeva prisutni su i hidroksiizokromani, flavonoidi (flavoni, flavonoli, antocijani) te lignani koji mogu poslužiti kao marker za vrstu masline iz koje je ulje dobiveno (20).



Slika 8. Strukture sekoiridoida u maslinovom ulju

U maslinovom ulju prisutno je i oko 280 hlapljivih spojeva (karbonilni spojevi, alkoholi, esteri, ugljikovodici i dr.) od čega samo sedamdesetak pridonosi mirisu, a dvadesetak okusu maslinovog ulja. Ostali su prisutni u toliko niskim koncentracijama da ih osjetilima ne možemo zamijetiti (5).

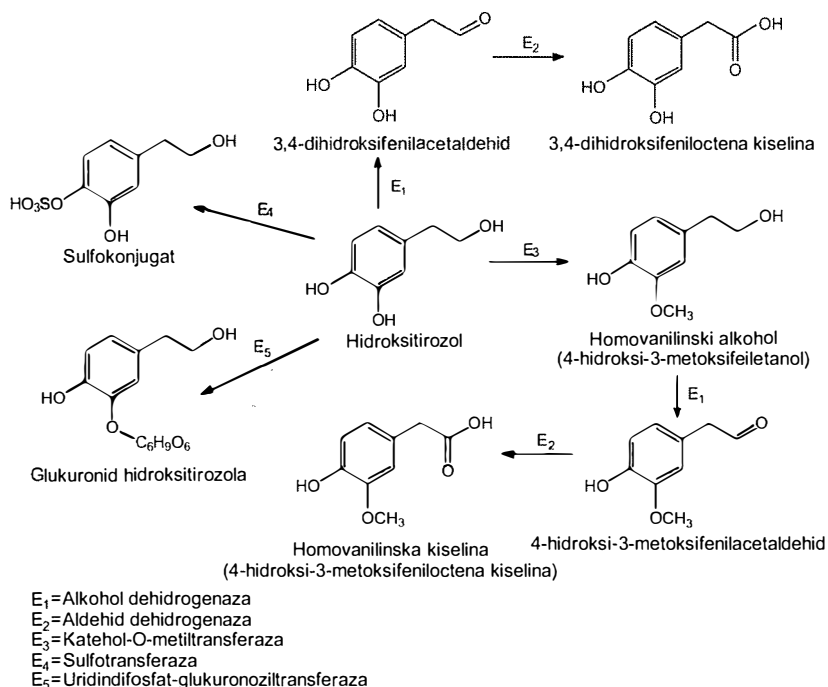
Bioraspoloživost fenolnih spojeva iz ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja

Bioraspoloživost upućuje na odnos količine unesenog maslinovog ulja u organizam i dijela koji je stvarno probavljen, apsorbiran i metaboliziran uobičajenim biokemijskim procesima. Informacije o apsorpciji i raspoloživosti fenolnih spojeva iz ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja bitne su u određivanju potencijalnog pozitivnog učinka na zdravlje (11). Većina istraživanja o bioraspoloživosti fenola iz maslinovog ulja usmjerena su uglavnom na tirozol, hidroksitirozol i oleuropein. Tirozol i hidroksitirozol apsorbiraju se 10-tak minuta nakon ingestije, a koncentracija u serumu ovisi o

dozi i može varirati od 55 do 66 % kod ljudi (1). Bioraspoloživost tirozola i hidrokstitirazola je veća kada se uzimaju kao sastavni dio maslinovog ulja nego kao vodena otopina. Pretpostavlja se da antioksidansi prisutni u ekstra djevičanskom maslinovom ulju mogu spriječiti raspad fenolnih spojeva u probavnom sustavu prije apsorpcije (11). Tirozol i hidrokstitirozol su male polarne molekule i smatra se da se apsorbiraju pasivnom difuzijom. Oleuropein je veća polarna molekula koja u svojoj strukturi sadrži glukozu pa vjerojatno za prolaz kroz membrane epitelnih stanica intestinalnog trakta koristi transportere za glukozu (12).

Već pri unosu umjerenih doza maslinovog ulja (25 mL na dan) 37 do 98 % fenola prisutni su u plazmi i urinu u obliku konjugata, uglavnom glukuronida, što upućuje na opsežni metabolizam prvim prolazom kroz jetru (18).

Važan korak u metabolizmu oleuropeina, oleuropein aglikona i ligstrozida je oslobađanje tirozola ili hidrokstitirozola iz njihovih struktura. Hidrokstitirozol se brzo eliminira iz plazme i izlučuje putem mokraćne u slobodnom obliku (približno 15 %) ili vezan za glukuronsku kiselinu, a u manjoj količini (5 %) izlučuje se fecesom. Osim glukuronida, u mokraći zdravih dobrovoljaca zabilježen je značajan porast homovanilinskog alkohola i homovanilinske kiseline nastalih metabolizmom hidrokstitirozola uz enzim katehol-O-metiltransferazu (slika 9.) (1, 11, 12). Svakako su potrebna daljnja

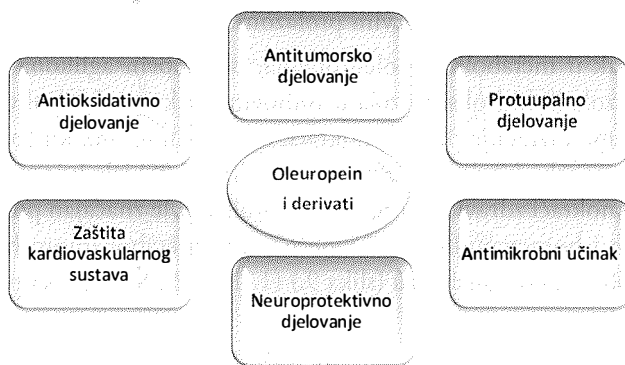


Slika 9. Pretpostavljeni enzimatski putevi biotransformacije hidrokstitirozola *in vivo* (11)

istraživanja da bi se potpuno objasnio mehanizam apsorpcije i metabolizam fenolnih spojeva iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Biološka aktivnost fenolnih spojeva iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Rezultati istraživanja fenolnih spojeva iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja ukazala su na njihove važne biološke učinke koji mogu povoljno djelovati na zdravlje ali imati i preventivno djelovanje na razvoj kroničnih degenerativnih bolesti. Na slici 10. prikazane su neke biološke aktivnosti važnih fenolnih spojeva oleuropeina i njegovih derivata (1).



Slika 10. Biološki učinci oleuropeina i derivata oleuropeina

Antioksidativno djelovanje

Normalnim metaboličkim procesima u tijelu nastaju slobodni radikali, dok ih manji dio dolazi iz okoliša. Slobodni radikali sadrže jedan nespareni elektron u vanjskoj ljusci i imaju izrazito visok stupanj reaktivnosti i afinitet prema proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama, ugljikohidratima i drugim makromolekulama (22). Zbog prekomjernog stvaranja slobodnih radikala u tijelu i smanjene antioksidacijske zaštite nastaje oksidoredukcijski stres (oksidativni stres) koji može dovesti do karcinogeneze i razvoja bolesti poput ateroskleroze, dijabetesa, reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti, autoimunih bolesti i dr. (12, 23).

Organizam se štiti od oksidativnog stresa endogenim molekulama poput glutathiona, koenzima Q10, transferina, bilirubina te enzimatskim sustavima poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze (22). Egzogeni antioksidansi poput polifenola, α -tokoferola i β -karotena unose se u tijelo izvana, npr. hranom (23). Glavni antioksidansi u djevičanskom maslinovom ulju su fenolni spojevi, karotenoidi, tokoferoli, steroli i izoprenoidi (skvalen) (12, 24).

Antioksidativno djelovanje fenola *in vivo* povezano je s njihovom strukturom (*o*-dihidroksi spojevi imaju veći antioksidativni kapacitet u odnosu na hidroksi spojeve),

apsorpcijom, bioraspoloživosti, metabolizmom i farmakokinetikom (19). Usporedbom antioksidativnog učinka raznih polifenolnih spojeva, na temelju njihove mogućnosti da inhibiraju stvaranje peroksida, pokazalo se da hidroksitirozol, oleuropein aglikon, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina i kavena kiselina imaju najveću antioksidativnu zaštitnu ulogu (12). Štoviše, 3-O-glukuronid hidroksitirozola (metabolit hidroksitirozola u organizmu) pokazao je veću aktivnost kao hvatač slobodnih radikala od samog hidroksitirozola (18). Glikozilacija umanjuje antioksidativnu aktivnost polifenola, pa je oleuropein aglikon aktivniji od oleuropein glikozida, ali i od ligstrozid aglikona koji ima samo jednu hidroksilnu skupinu (25).

Zapažen je sinergistički učinak sastavnica maslinovog ulja gdje ekstrakti maslinovog ulja koji sadrže smjesu poznatih i nepoznatih fenola učinkovitiji su u znatno manjim koncentracijama nego pojedini spojevi samostalno (26).

Protuupalno djelovanje

SVAKODNEVNI UNOS EKSTRA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA S VISOKOM KONCENTRACIJOM fenola može ublažiti upalni odgovor organizma i tako smanjiti razvoj kroničnih upalnih bolesti poput artritisa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te tumora (27). Razna istraživanja *in vitro* i *in vivo* potvrdila su antiinflamatorno i antitrombotско djelovanje fenola iz maslinovog ulja. Naime, 2 do 6 sati nakon konzumacije djevičanskog maslinovog ulja, dolazi do značajnog sniženja inflamatornih markera (TxB₂ i TLB₄) u serumu. Isti rezultati nisu dobiveni nakon konzumacije rafiniranog maslinovog ulja ili kukuruznog ulja (20).

Oleokantal djeluje kao prirodni protuupalni spoj s potencijalom i profilom sličnim nesteroidnom protuupalnom lijeku ibuprofenu. Iako su molekule strukturno različite, obje inhibiraju iste enzime: ciklooksigenazu 1 i 2 (COX-1, COX-2) koji sudjeluju u sintezi prostaglandina. Oba enantiomera oleokantala uzrokuju inhibiciju enzima a djelovanje je ovisno o dozi (28).

FENOLNI SPOJEVI IZ EKSTRA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA smanjuju koncentraciju citokina interleukin-6 (IL-6) i C-reaktivnog proteina (CRP) u pacijenata s koronarnom bolešću dok je biosinteza citokina IL-12 s proupalnom aktivnošću bitnog za uklanjanje unutarstaničnih mikroorganizama, npr. bakterije *Listeria monocytogenes* i citokina IL-4 s antiupalnom aktivnošću bitnog za uklanjanje izvanstaničnih mikroorganizama povećana. Hidroksitirozol *in vivo* inhibira ekspresiju upalnih citokina TNF α (engl. *tumor necrosis factor* α) i IL-1 β (1, 29). Na temelju dobivenih rezultata, pretpostavlja se da se sinteza drugih citokina može modulirati konzumacijom maslinovog ulja.

POZITIVNO DJELOVANJE oleokantala i njegovih derivata uočeno je i kod osteoartritisa smanjenjem ekspresije inducibilnog oblika enzima NO-sintaza (iNOS) u hrskavici oboljelih pacijenata (30).

Osim zbog fenolnih spojeva, ekstra djevičansko maslinovo ulje i zbog svog karakterističnog lipidnog sastava može umanjiti upalne procese kod autoimunih bolesti bez narušavanja osjetljivosti imunološkog sustava na patogene mikroorganizme (29).

Zaštita kardiovaskularnog sustava

Antioksidativna aktivnost hidroksitirozola i oleuropeina povezana je i s prevencijom nastanka kardiovaskularnih bolesti, posebno ateroskleroze. Ispitivanja *in vitro* i *in vivo* pokazala su značajno smanjenje plazmatske razine ukupnog, slobodnog i esterificiranog kolesterola, triglicerida i lipoproteina male gustoće (LDL), smanjenu aktivnost HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) reduktaze i povećanu koncentraciju lipoproteina visoke gustoće (HDL) (1, 12). Osim fenolnih spojeva i mononezasićene masne kiseline pogoduju stvaranju LDL-a osjetljivog na oksidativne procese (3).

Fenolni spojevi iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja u ispitivanjima *in vitro* inhibiraju ekspresiju endotelnih adhezivnih molekula na humanim trombocitima. Hidroksitirozol u potpunosti inhibira aktivnost i agregaciju trombocita u koncentracijama 100–400 μM i njegov učinak na agregaciju trombocita induciranu kolagenom, sličan je učinku acetilsalicilne kiseline (11, 12).

Nakon konzumacije ekstra djevičanskog maslinovog ulja, s visokim sadržajem fenolnih spojeva (400 mg/kg), u plazmi dolazi do snižavanja razine inhibitora plazminogen aktivatora 1 (PAI-1) i faktora VII (FVII) koji spadaju u prokoagulacijske faktore koji utječu na razvoj tromboze i koronarne srčane bolesti, a utječu i na smanjenje koncentracije homocisteina koji povećava adhezivnost endotela. Nedavna istraživanja pokazala su da su oleuropein aglikon i luteolin također potencijalni inhibitori agregacije trombocita (1). Slično djelovanje pokazuju i dva derivata hidroksi-izokromana izolirana iz djevičanskog maslinovog ulja (20).

Antitumorsko djelovanje

Iako razvoj tumora obuhvaća niz procesa i promjena, u većini slučajeva dolazi do deregulirane stanične proliferacije i potisnute apoptoze. Apoptoza predstavlja zaštitni mehanizam od neoplastične transformacije i razvoja tumora na način da eliminira genetički oštećene stanice. Apoptozu zdravih stanica mogu aktivirati oksidansi, toksične tvari, lijekovi i ionizirajuće zračenje poticanjem stvaranja signala stresa i velikih količina reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (31).

Polifenoli posjeduju kemoprotektivnu ulogu na raznim organima gdje sprječavaju nastanak specifičnih tumora. Na proces kancerogeneze djeluju s nekoliko mehanizama: inhibiraju sintezu DNK, moduliraju proizvodnju ROS-a, reguliraju apoptozu, moduliraju stanično preživljavanje i proliferaciju. Polifenoli mogu direktno utjecati i na različite točke procesa apoptoze i ekspresiju regulatornih proteina (32).

In vitro istraživanja polifenolnih spojeva iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja pokazala su inhibiciju proliferacije stanica različitih vrsta humanih tumora: adenokar-

cinoma dojke (MCF-7), karcinoma mokraćnog mjehura (T-24) i karcinoma gingive (HSG₁). Dobri rezultati dobiveni su i na malignim stanicama endotela kapilara govdega mozga (BBCE) (16, 32).

Hidroksitirozol se pokazao učinkovitim kod humane promijelocitne linije stanica HL60 kod pacijenta oboljelih od leukemije (16, 33). Hidroksitirozol ima snažan antiproliferativni učinak izražen kod ispitivanja na humanim stanicama kolonalnog adenokarcinoma (1). Druga istraživanja provedena *in vitro* pokazala su da spojevi tirozol, pinorezinol i kavena kiselina pojedinačno ne pokazuju pozitivan učinak na stanice kolonalnog adenokarcinoma (HT 115), ali smjesa spomenutih spojeva inhibirala je invazivnost HT 115 stanica za 45–55 %. Takav rezultat upućuje na snažan sinergistički učinak fenolnih spojeva iz maslinovog ulja (34).

Oleuropein aglikon pokazao se najpotentnijim fenolnim spojem koji djeluje na stanice raka dojke. Istraživanjima je utvrđeno da HER2 onkogenom pojačane SKBR3 stanice raka dojke su pet puta osjetljivije na oleuropein aglikon od HER2-negativnih MCF-7 staničnih linija raka dojke (32). Neka istraživanja pokazala su da oleuropein i hidroksitirozol induciraju smrt MCF-7 humanih stanica raka dojke inhibirajući proliferaciju i inducirajući apoptozu stanica (1, 32). Oleuropein aglikon ima sinergistički učinak s trastuzumabom kada se stanice raka dojke tretiraju nekoliko mjeseci (20).

Rezultati istraživanja oleuropina pokazala su njegov pozitivan učinak na inhibiciju tomorskih stanica kod diferenciranog glioblastoma (LN-18), eritroleukemije (TF-1a) adenokarcinoma bubrega (786-O), karcinoma dojke (T-47D) i kolateralnog adenokarcinoma (LoVo) (32).

Antikancerogeni učinak fenolnih spojeva iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja proučavan je i na koži oštećenoj djelovanjem UV zraka. Pokusi na životinjama otkrili su da naknadni tretman kože ekstra djevičanskim maslinovim uljem, odmah nakon UV- zračenja, odgađa početak i smanjuje broj promijenjenih stanica, ali prethodni tretman s ekstra djevičanskim maslinovim uljem i pre/post tretman s rafiniranim maslinovim uljem (bez fenola) ne usporava i ne sprječava nastanak tumorskih stanica kože (16).

Antimikrobni učinak

Brojna *in vitro* istraživanja pokazala su da fenolni spojevi iz ekstra djevičanskog maslinova ulja posjeduju brojna antimikrobna svojstva djelujući na bakterije, gljivice, viruse i protozoe. Smatra se da fenolni spojevi imaju antibakterijski učinak zbog prisutnosti *o*-dihidroksi sustava (kateholi) (12). Mehanizam djelovanja fenolnih spojeva je različit. Mogu djelovati na membranu mikroorganizama povećanjem površinske aktivnosti i narušavajući stanični peptidoglikan, utjecati na proces proizvodnje određenih aminokiselina potrebnih za rast mikroorganizama ili stimulirati fagocitozu kao odgovor imunološkog sustava na mikrobe svih vrsta (32).

Tirozol pokazuje antibakterijski učinak na bakterije *Moraxella catarrhalis* i bakterije *Haemophilus influenzae* (12). Hidroksitirozol i oleuropein djeluju bakteriostat-ski i baktericidno na bakterije *Staphylococcus aureus*, bakterije *Salmonellae enteritidis* i bakterije *Bacillus cereus*, dok oleuropein i drugi fenolni spojevi (*p*-hidroksibenzojeva kiselina, vanilna kiselina i *p*-kumarinska kiselina) u potpunosti inhibiraju razvoj bakterija *Klebsiella pneumoniae*, bakterija *Escherichia coli* i bakterija *Bacillus cereus*. Verbaskozid pokazuje antibakterijski učinak prema bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* te drugim bakterijama od kliničke važnosti (12). Oleokantal se ne hidrolizira u želucu te tako pomaže u inhibiciji rasta bakterije *Helicobacter pylori* (27).

Oleuropein djeluje i na različite vrste virusa raznim načinima inhibicije njihove reprodukcije i stimulacijom fagocitoze (12). Djeluje antiviralno na virus *Herpes mono-nucleosis*, virus hepatitisa, rotavirus, bovine (govedi) rhinovirus, canine (pseći) parvo-virus, feline (mačji) leukemia virus, respiracijski sincicijski virus (koji utječe na humani respiratorni sustav) i virus para-influence tip 3 (32).

Oleuropein ima blag utjecaj na odgodu razvoja i sporulacije plijesni *Aspergillus parasiticus* kao i na smanjenje proizvodnje aflatoksina, ali krajnji rast je ipak stimuli-ran. Pretpostavlja se da oleuropein može djelovati kao izvor ugljika i povećati rast micelija. Za razliku od oleuropeina, hidroksitirozol je pokazao slab inhibitorni učinak na neke sojeve plijesni *Penicillium* i plijesni *Aspergillus* (12, 35).

Neuroprotektivno djelovanje

Starenje tijekom životnog vijeka je i rezultat stanične disfunkcije kao posljedice oksidativnog oštećenja i to uglavnom mitohondrija. Membrane mitohondrija su osjetljive na slobodne radikale zbog prisutnosti dvostrukih veza u fosfolipidima što u konačnici, zbog njihova oštećenja, dovodi do razvoja kognitivnih i neurodegenerativ-nih bolesti kao što je Alzheimerova bolest. *In vitro* i epidemiološka istraživanja su istakla pozitivan učinak polifenola na učestalost poremećaja starenja kao što je de-mencija (32).

Oleokantal sudjeluje u smanjenju incidencije Alzheimerove bolesti. Na stanič-noj razini bolest karakterizira nastanak amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova. Izvanstanični amiloidni plakovi tj. oligomeri A β (β -amiloida) vežu se na postsinaptič-ka mjesta i uzrokuju gubitak sinaptičke funkcije i oštećenje neurona. Neurofibrilarni čvorovi nalaze se unutar neurona. Građeni su od neurofilamena koji se sastoje od fosforiliranih oblika mikrotubularnih proteina (Tau proteina) (1). Oleokantal inhibi-ira nakupljanje Tau proteina i ima sposobnost da promijeni oligomerizacijsko stanje A β oligomera, a istodobno štiti neurone hipokampusu od sinaptopatološkog efekta A β (30). Osim toga, oleokantal regulacijom glavnih A β transportnih proteina u krv-no-moždanoj barijeri: P-glikoproteina (P-gp) i LDL lipoprotein receptora vezanih na protein-1 (LRP1) može povećati klirens A β (36). Druga istraživanja upućuju da i oleuropein može smanjiti ili čak spriječiti nakupljanje A β u mozgu (37).

Istraživanjima na štakorima utvrđena je i neuroprotektivna uloga hidroksitirozola koji smanjuje aktivnost laktat dehidrogenaze što je povezano sa smanjenjem lipidne peroksidacije u mozgu (1).

Ostali učinci

Učink na starenje stanica

Pod utjecajem genetskih i vanjskih faktora, neprestanim dijeljenjem ljudski fibroblasti vremenom stare. *In vitro*, oleuropein poboljšava aktivnost proteasoma koji usporavaju starenje humanih fibroblasta. Očuvanjem funkcije fibroblasta tijekom replikacije stanica smanjuje se količina oksidiranih proteina u stanici. Oleuropein utječe pozitivno na morfologiju stanica gdje je vidljiva odgoda u procesu starenja, a životni vijek stanica je produžen za 15 % (32).

Učink na kosti

U istraživanjima učinka fenolnih spojeva iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja na kosti, provedenim na štakorima, uočeno je da tirozol i hidroksitirozol značajno povećavaju izgradnju koštane mase. Autori istraživanja su zaključili da se konzumacijom ekstra djevičanskog maslinovog ulja može spriječiti gubitak koštane mase. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja koja bi potvrdila ove rezultate (1).

Učink na probavu

Pri ispitivanju biološkog učinka lipida iz maslinovog ulja na probavni sustav, istraživanja provedena na ljudima i životinjskim modelima pokazuju da, u usporedbi s drugim lipidima, konzumacija ekstra djevičanskog maslinovog ulja utječe na razinu nekih cirkulirajućih crijevnih peptida: gastrina, kolekistokinina, polipeptida gušterače, sekretina, somatostatina i peptida YY (peptid tirozin-tirozin). Lipidi iz maslinovog ulja, naročito oleinska kiselina, moduliraju sekreciju gastrointestinalnih hormona što bi moglo biti od koristi u planiranju enteralne prehrane u pacijenata s različitim bolestima probavnog sustava (3).

S obzirom na blagotvorno djelovanje maslinovog ulja na ljude što je vidljivo iz njegove dugotrajne uporabe tijekom povijesti te potvrde bioloških učinaka kroz znanstvena istraživanja (*in vivo* i *in vitro*) svakako bi u budućnosti trebalo istražiti i propisati načine kontrole sadržaja tvari koje su biološki aktivne. Dodatna istraživanja sastava određivanjem strukturnih svojstava molekula koje pokazuju biološku aktivnost te proučavanje sinergističkih učinaka predstavlja svijetlu perspektivu u farmaceutskoj primjeni maslinovog ulja.

SAŽETAK

Maslinovo je ulje oduvijek bila važna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva, a zbog blagotvornog djelovanja na zdravlje i dugovječnost kroz vjekove, danas je postalo sinonim zdravog načina prehrane u cijelom svijetu.

Glavni razlog porasta potrošnje maslinovog ulja je njegova prehrambena, preventivna ali i terapijska vrijednost. Blagotvorni učinci maslinovog ulja pripisivali su se visokom udjelu mononezasićenih masnih kiselina (naročito oleinskoj), međutim eksperimentalna istraživanja (*in vivo* i *in vitro*) upućuju na veliki biološki potencijal fenolnih spojeva, posebno tirozola, hidroksitirozola, oleuropina i oleokantala koji posjeduju visoku antoksidativnu i antiinflamatornu aktivnost, pozitivni učinak na zaštitu kardiovaskularnog sustava te neuroprotektivni i antimikrobni učinak.

Olive oil – composition and biological activity of phenolic compounds

by J. Pejović, M. Barbarić, C. Jakobušić Brala

Abstract

Olive oil has always been important ingredient in daily diet of Mediterranean population, and because of its beneficial effects on health and longevity through the centuries, today it has become a synonym for healthy nutrition worldwide. The main reason for the increase in consumption of olive oil is its nutritional, preventive and therapeutic value. The beneficial effects of olive oil are attributed to the high content of monounsaturated fatty acids (especially oleic acid), but the experimental studies (*in vivo* and *in vitro*) suggest a high biological potential of olive oil phenolic compounds. Because of its high antioxidant and anti-inflammatory activity, antimicrobial and neuroprotective effects, the ability to positively regulate cell processes, these compounds have a beneficial effect on physiological processes related to health and disease.

1. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sc.*, 2010; 11: 458–479.
2. Domac R. Flora Hrvatske – priručnik za određivanje bilja. II. izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 2002.
3. Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Yaqoob P. Olive oil and health. Oxfordshire, CABI Publishing, 2006
4. Lozano-Sanchez J, Giambanelli E, Quirantes-Pine R, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Wastes generated during the storage of extra virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 11491–11500.
5. Boskou D. Olive oil chemistry and technology. 2nd ed., Champaign, Illinois: AOCS Press, 2006.
6. Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barbarić A. Ukupne fenolne tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima. *Pomologia Croatica.* 2007; 13: 17–30.
7. Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, 2009, Zagreb, Narodne novine, broj 7 (NN/07/09).
8. European pharmacopoeia, 6th edition, volume 2, Council of Europe, Strasbourg, 2008.
9. European pharmacopoeia – supplement 6.2. to the 6th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2008.

10. European pharmacopoeia – supplement 6.6. to the 6th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2010.
11. Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RSJ. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci.* 2009; 49: 218–236.
12. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi 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.
13. Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica.* 2006; 12: 159–173.
14. <http://good-wallpapers.com/food/21792>, datum pristupa: 07.01.2014.
15. <http://www.oliveoilsource.com/oliveoilchemistrybyGuidoCosta.pdf>, datum pristupa: 07.01.2014.
16. López S, Pacheco YM, Beatriz Bermúdez B, Abia R, Muriana FJG. Olive oil and cancer. *Grasas Aceites.* 2004; 55: 33–41.
17. <http://www.oliveoilsource.com/page/chemical-characteristics>, datum pristupa: 07.01.2014.
18. Covas MI, Ruiz-Gutierrez V, de la Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventos RM, Osada J, Owen RW, Visioli F. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutr Rev.* 2006; 64: 20–30.
19. Visioli F, Bogani P, Grande S, Galli C. Olive oil and oxidative stress. *Grasas Aceites.* 2004; 55: 66–75.
20. Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. *Molecules.* 2007; 12: 1679–1719.
21. Boselli E, Di Lecce G, Strabbioli R, Picalisi G, Frega NG. Are virgin olive oils obtained below 27°C better than those produced at higher temperatures. *Food Sci Technol-LEB.* 2009; 42: 748–757.
22. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix.* 2004; 52: 98–102.
23. Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina.* 2007; 43: 84–93.
24. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoides, lignans and squalene. *Food Chem Tox.* 2000; 38: 647–659.
25. Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem.* 2010; 121: 105–111.
26. Fabiani R, Sepporta MV, Mazza T, Rosignoli P, Fuccelli R, De Bartolomeo A, Crescimanno M, Taticchi A, Esposto S, Servili M, Morozzi G. Influence of cultivar and concentration of selected phenolic constituents on the in vitro chemiopreventive potential of olive oil extracts. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 8167–8174.
27. Cicerale S, Lucas LJ, Keast RSJ. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotech.* 2012; 23: 129–135.
28. Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PAS. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature.* 2005; 437: 45–46.

29. Puertollano MA, Puertollano E, de Cienfuegos GA, de Pablo MA. Aceite de oliva, sistema inmune e infección. *Nutr Hosp.* 2010; 25: 1–8.
30. Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr Pharm Design.* 2011; 17: 754–768.
31. D'Archivio M, Santangelo C, Scaccocchio B, Vari R, Filesi C, Masella R, Giovannini C. Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: Relevance for cancer prevention. *Int J Mol Sci.* 2008; 9: 213–228.
32. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm.* 2010; 78: 133–154.
33. Fabiani R, Rosignoli P, Fuccelli R, Pieravanti F, De Bartolomeo A, Morozzi G. Involvement of hydrogen peroxide formation on apoptosis induction by olive oil phenolic compounds. *Czech J Food Sci.* 2009; 27: 197–199.
34. Hashim YZHY, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro GF, Kaisalo L, Wahala K, Gill CIR. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int J Cancer.* 2008; 122: 495–500.
35. Keceli T, Robinson RK. Antimicrobial activity of phenolic extracts from virgin olive oil. *Milchwissenschaft.* 2002; 57: 436–440.
36. Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A. Olive oil derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. *ACS Chem Neurosci.* 2013; 4: 973–982.
37. Bazoti FN, Bergquist J, Markides K, Tsarbopoulos A. Noncovalent Interaction between Amyloid- β -Peptide and Oleuropein Studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006; 17: 568–575.

Primljeno 15. siječnja 2014.