

Određivanje biomedicinskih važnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju i plodu masline

Komšić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:951455>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



Karla Komšić

**Određivanje biomedicinski važnih fenolnih
spojeva u maslinovom ulju i plodu
masline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Biokemija lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju i Zavodu za fizikalnu kemiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Monike Barbarić i komentorstvom dr. sc. Ane Karković Marković.

Zahvale

Od srca zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić i komentorici dr.sc. Ani Karković Marković na ukazanom povjerenju, razumijevanju, stručnosti i pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju i Zavoda za fizikalnu kemiju na pomoći i ugodnom društvu.

Velike zahvale želim iskazati svim svojim prijateljima koji su prolazili sa mnom kroz moje sretno i tužno studentske dane stvarajući životne uspomene i nazdravljajući za svaki (ne)položeni ispit.

I najveće zahvale dugujem svojoj obitelji koja je privela moje školovanje kraju uz ustrajno bodrenje, nesebičnu podršku, motivaciju i omogućene sve odjevne kombinacije za usmene ispite.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Botanički podatci	1
1.1.2. Rod <i>Olea</i> L. (maslina).....	1
1.2. Vrsta <i>Olea europea</i> L. (maslina).....	1
1.2.1 Plod masline.....	3
1.2.2. Maslinovo ulje	4
1.3. Polifenoli.....	6
1.3.1. Opće značajke	6
1.3.2 Tirozol.....	9
1.3.3 Hidroksitirozol	10
1.3.4. Oleuropein.....	12
1.3.4. Oleacein	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Biljni materijali	17
3.2. Aparatura i kemikalije.....	17
3.3 Metoda	18
3.3.1. Ekstrakcija.....	18
3.3.2. Identifikacija i kvantifikacija	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. ULJE	21
4.2. PLOD	23
4.3.USPOREDBA SADRŽAJA FENOLA U ULJU I PLODU KULTIVARA OBLICA	25
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. LITERATURA	28
7. SAŽETAK/SUMMARY	31
8. PRILOZI	33
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	

1. UVOD

1.1. Botanički podatci

Porodica *Oleaceae* (maslinovke)

Biljna porodica *Oleaceae* (maslinovke) pripada u carstvo biljaka *Plantae*, red *Lamiales*. Sama se porodica sastoji od 24 živića roda i 900 vrsti.

U živiće rodove ubrajamo: *Abeliophyllum*, *Chionanthus*, *Comoranthus*, *Fontanesia*, *Forestiera*, *Forsythia*, *Fraxinus*, *Haenianthus*, *Hesperelaea*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Linociera*, *Menodora*, *Myxopyrum*, *Nestegis*, *Noronhia*, *Noronhia*, *Notelaea*, *Olea*, *Osmanthus*, *Phyllyrea*, *Picconia*, *Schrebera*, *Syringa Tassarandra*.

Uglavnom se radi o drvenastim biljkama ili grmovima. Listovi porodice su nasuprotni te mogu biti jednostavni ili složeni, zimzeleni ili listopadni. Raste na Mediteranu, u Africi i Aziji, južnom dijelu Sjeverne Amerike, Srednjoj i Južnoj Americi te u Australiji. (<https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/Delta/Description>)

1.1.2. Rod *Olea* L. (maslina)

Rod *Olea* sastoji se od 40-ak vrsti od kojih će nam u radu značajna biti vrsta *Olea europea* L. Vrsta *Olea paniculata* od značaja je zbog svog iznimnog tvrdog debla, a *Olea laurifolia* od velikog je značaja u Africi. (<https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/Delta/Description>)

1.2. Vrsta *Olea europea* L. (maslina)

Vrsta maslina *Olea europea* L. zimzeleno je stablo koje može narasti 3 do 13 metara. Počela se uzgajati na Kreti još prije 3500 godina zbog svoje ljepote i hranjivih plodova. Stablo može doseći starost do 2000 godina (Slika 1.). Iako dobro uspijeva na svim vrstama tla, najkvalitetnije plodove daje na vapnenastom i oskudnom tlu.

Budući da je proizvodnja masline veoma rasprostranjena, razvijeni su brojni kultivari, varijeteti i kulture kako bi se prilagodili uvjetima klime i okoliša. Danas vrsta *Olea europea* L. broji čak 2000 varijeteta (<http://www.agroledina.hr/maslina.php>).

Za Hrvatsku je karakteristična 31 sorta. Neke od autohtonih sorti za Hrvatsku su: Oblica, Črnica, Istarska bjelica, Buža, Plominka, Lastovka.

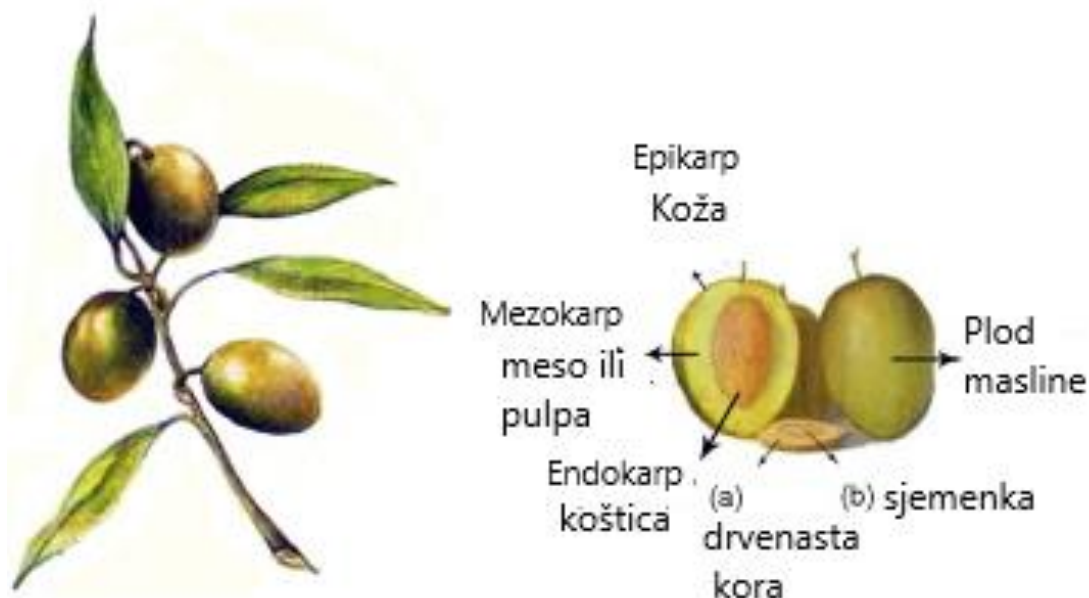
U ovom radu korišteno je ulje i plod Oblice. (<http://www.oleacult.com/hr/footer/hrvatske-maslinarske-sorte-2>)



Slika 1. Stablo masline s Brijuna staro oko 1600 godina

(https://www.np-brijuni.hr/imagecache/maxsize/6f67e492-4a50-4136-93fd-89f06287a549/28-02-2019/img_1771.jpg)

1.2.1 Plod masline



Slika 2. Presjek ploda masline (uz prilagodbu:

<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780123744203001455-gr1.jpg>)

Plod masline (Slika 2.) spada u skupinu koštunica: sastoji se od mekog dijela, mezokarpa ili pulpe, od tvrdog dijela, endokarpa ili koštice te od epikarpa ili kože. Koštica se sastoji od dvije regije, vanjskih drvenastih stanica i sjemenka unutar te čvrste barijere. Ovalna je oblika veličine 2-3 cm, pulpa zauzima 84-90% ukupne mase ploda, a masa varira između 2 i 12 grama. Sam plod sastoji se od: vode (50%), proteina (1,6%), ulja (22%), ugljikohidrata (19,1%), celuloze (5,8%), anorganskih spojeva (1,5%) i fenolnih spojeva (1-3%). U plodu su također zastupljeni pektini, tokoferoli, fitosteroli, karotenoidi, skvalen. Rast i razvoj traje oko 5 mjeseci ukoliko su klimatski uvjeti povoljni (Ghanbari i sur., 2012).

1.2.2. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje produkt je ekstrakcije ploda masline. 90-99% sadržaja ulja čini glicerolna frakcija ili osapunjivi dio, dok ostatak čini neosapunjiva frakcija (0,4-5%) (Tripoli i sur., 2005).

1.2.2.1. Klasifikacija maslinovog ulja

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja na temelju članka 94. stavka 2. i članka 95. stavka 3. Zakona o hrani («Narodne novine» br. 46/07), ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi Pravilnik o uljima od ploda i komine masline donosi odredbe o kategorizaciji, nazivlju i definiciji ulja, tehnološkim postupcima proizvodnje i prerade, fizikalno- kemijskim i senzorskim svojstvima itd.

Ulje se dijeli u 6 kategorija uz sljedeće nazive:

1. Djevičanska maslinova ulja

a) Ekstra djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.

b) Djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.

c) Maslinovo ulje lampante je djevičansko maslinovo ulje neprihvatljivih senzorskih 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, koje ne sadrži više od 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, koji 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, koji ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.

6. Ulje komine maslina 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. (NN br.7/2009)

1.2.2.2. Kemijski sastav maslinovog ulja

Glicerolna frakcija maslinovog ulja sastoji se uglavnom od nezasićenih masnih kiselina, a sastav se razlikuje između sorti. Glicerolna frakcija je okosnica maslinova ulja u prehrambenom smislu i sastav je reguliran prema Međunarodnom savjetu za maslinovo ulje (IOOC - International Olive Oil Council). Regulativa propisuje 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%.

U neosapunjivu frakciju spadaju svi oni spojevi koji su nastali sekundarnim metabolizmom stabla i ploda. Zahvaljujući antioksidativnim svojstvima ti spojevi čine terapijsku okosnicu maslinovog ulja. Čak 60% neosapunjive frakcije čine ugljikovodici od kojih je najzastupljeniji skvalen. Nadalje nalazimo tokoferole, sterole, karotenoide, klorofil, alifatske alkohole i fenolne spojeve.

Tokoferoli sprječavanju autooksidaciju, odnosno kvarenje ulja i dolaze u količinama 150-330 mg/kg koja premašuje potrebne količine za konzervaciju tako da preostali dio ima značajnu ulogu kao izvor vitamina E.

Steroli pripadaju skupini fitosterola, a 93-97% ga čini β -sitosterol koji utječe na razine kolesterola tako što reducira crijevnu apsorpciju istog.

Karotenoidi čine 0,5 do 10 mg/kg ulja (izraženi kao β -karoten), a najvažniji su β -karoten, likopen i oksidirani derivati karotena (ksantofil).

Klorofil je pigment koji maslinovom ulju daje karakterističnu zelenu boju i zastupljen je od 0 do 10 mg/kg. Sadrži i sivozeleni klorofil a i žutozeleni klorofil b, te feofitin a i feofitin b smeđe boje u iznosu od 0,2 do 24 mg/kg. Feofitin je razgradni produkt klorofila. Maslinovo se ulje treba skladištiti u tamnim bocama jer prisutnost svjetla pospješuje oksidaciju ulja.

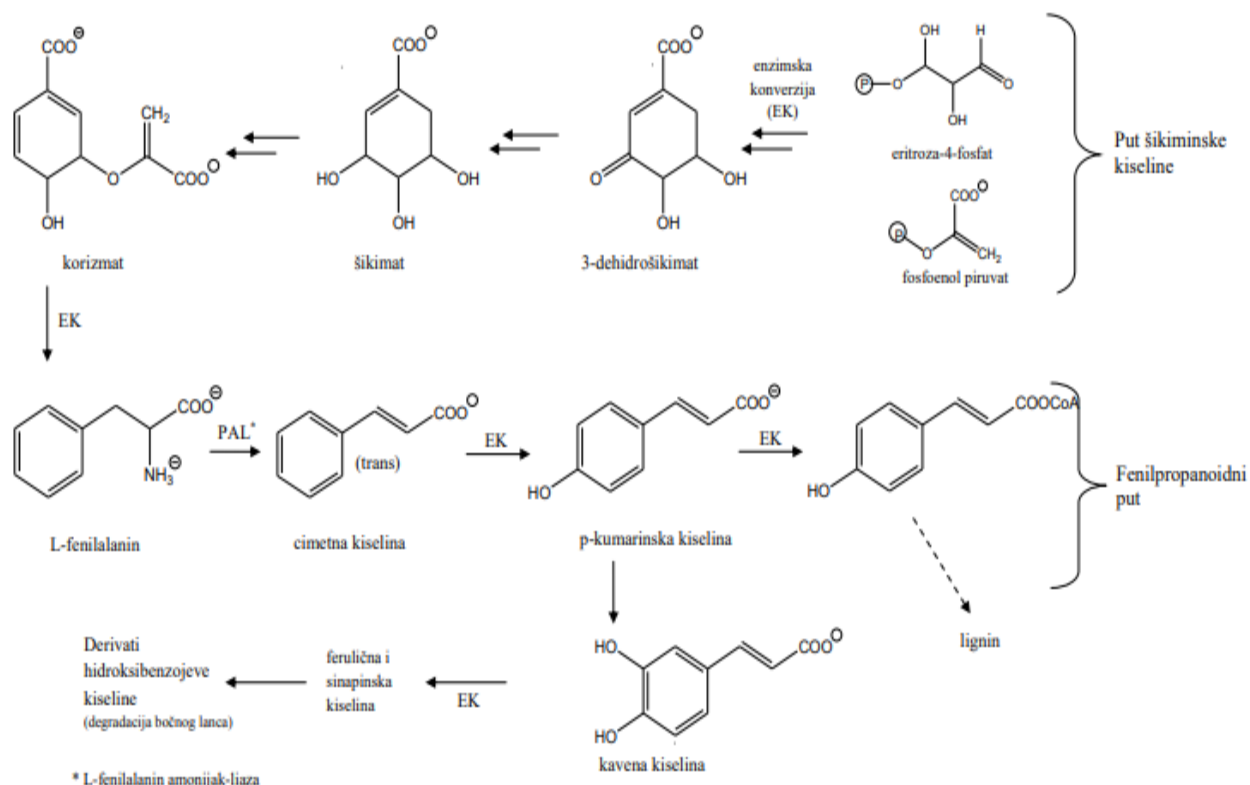
Alifatski alkoholi nalaze se u količini od 10 do 20 mg/100g ulja u slobodnom ili esterificiranom obliku. Značajni su kao intermedijerni spojevi u nastanku skvalena koji u daljnjem metabolizmu daju sterole. Okusu i mirisu maslinovog ulja pridonosi čak 90 spojeva, uglavnom aldehidi, ketoni i esteri (Žanetić i Gugić, 2006).

1.3. Polifenoli

1.3.1. Opće značajke

U fenolne spojeve biljnog porijekla spada 8000 strukturno karakteriziranih spojeva u koje spadaju jednostavni fenoli i benzokinoni (C_6), fenolne kiseline i aldehidi (C_6-C_1), fenilacetatne kiseline i acetofenoni (C_6-C_2), fenilpropanoidni derivati, hidroksicimetna kiselina, kumarini, izokumarini, kromoni (C_6-C_3), naftokinoni (C_6-C_4), ksantoni ($C_6-C_1-C_6$), stilbeni i antrakinoni ($C_6-C_2-C_6$), flavonoidi ($C_6-C_3-C_6$), lignani, neolignani (C_6-C_3)₂ i lignini (C_6-C_3)_n (Bravo, 1998).

U biljkama nastaju dvama biosintetskim putevima: putem šikiminske kiseline (slika 3.) te acetatnim putem.



Slika 3. Put šikiminske kiseline uz prilagodbu preuzeto iz: Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology *J. Agric. Food Chem* (2003) 51: 2866-2887.

Nalaze se u hrani kao što su voće, povrće, orašasti plodovi i žitarice te u pićima kao što su vino, čaj i kakao. Vrsta spoja i količina razlikuje se od izvora namirnice, zrelosti biljke, uvjetima okoliša, obradi i skladištenju. Najveći udio sadrže crno vino (do 6500 mg/L) i narančin sok (do 7100 mg/L), a dnevna procjena dnevnog unosa iznos oko 1g na dan (Bravo, 1998).

Što se tiče polifenolnih spojeva masline, najvažniji su sekoiridoidi, lignani, flavonoidi, fenolne kiseline i fenolni alkoholi.

Sekoiridoidi predstavljaju veliku frakciju polifenola plodu i ulju masline. U plodu se nalaze u obliku glikozida, a tijekom proizvodnog procesa pod utjecajem β -glukozidaza prelaze u slobodne forme - aglikone. Stoga su u ulju masline najzastupljeniji oleuropein aglikon dialdehid (olacein), ligstrozid aglikon dialdehid (oleokantal), oleuropein aglikon i ligstrozid aglikon. Za ovaj su rad značajni sekoiridoidi oleuropein i olacein.

Lignani su sljedeći najzastupljeniji u maslini sa značajnim udjelom (+)-1-acetoksinoresinola i (+)-1-pinoresinola.

Potom sadrži flavonoide od kojih su najznačajniji luteolin i apigenin.

Sljedeća važna skupina su fenolne kiseline s najvećim sadržajem vanilinske i kavene kiseline.

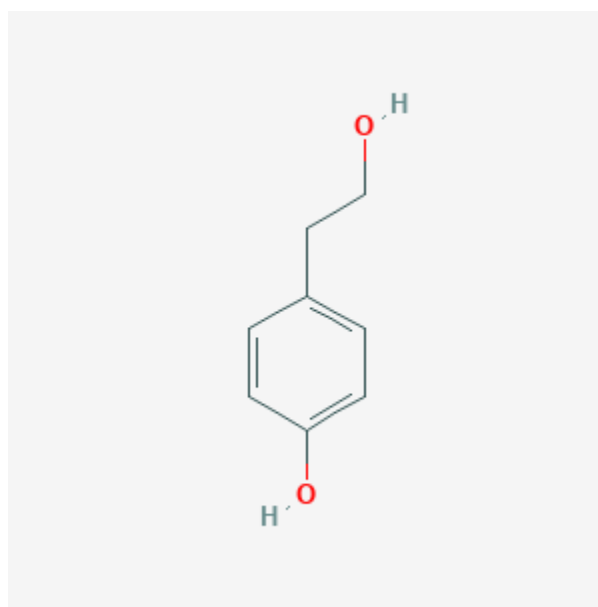
Za kraj je važno spomenuti fenolne alkohole, tirozol, hidroksitirozol koji su zbog svoje zastupljenosti u plodu i ulju masline te biomedicinske važnosti predmet istraživanja ovog rada.

Svakodnevni unos fenolnih spojeva ključan je zbog njihovih visokovrijednih svojstava: antioksidativnog, protuupalnog, antimikrobnog djelovanja te u prevenciji nastanka skleroze i raka (Tripoli i sur., 2005).

1.3.2 Tirozol

Tirozol je fenolni alkohol (slika 4.) koja se nakuplja unutar stanice nakon konzumacije i zbog toga djeluje kao stanični antioksidans. Zbog veoma stabilne strukture ne podliježe autooksidaciji za razliku od drugih polifenola. Djeluje na brojne molekularne mehanizme tako što inhibira oksidativni stres i oštećenje stanica (uslijed peroksidaza), u regulaciji signalnih puteva putem kinaza i povećava proizvodnju ATP-a.

Zahvaljujući svojim karakteristikama nudi alternativna rješenja u prevenciji i liječenju hipertenzije, ateroskleroze, kardiovaskularnih bolesti, zatajenja srca, inzulinske rezistencije i pretilosti (Karkovic Markovic i sur., 2019).



Slika 4. Kemijska struktura tirozola,
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10393#section=Structures>)

1.3.3 Hidroksitirozol

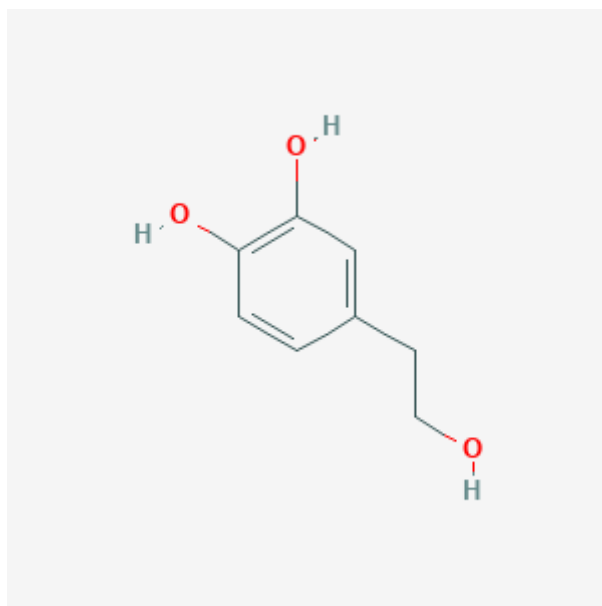
Hidroksitirozol je fenolni alkohol, katehol (slika 5.) koji spada u skupinu polifenola. Pokazao se kao najefikasnija antioksidativna molekula od svih 30-ak polifenola koje sadrži maslinovo ulje (Tuck KL et Hayball PJ, 2002).

Snažan je antioksidans na temelju mogućnosti hvatanja slobodnih radikala, keliranja metala i kao donor protona peroksidnim radikalima (ROO*) dajući nereaktivni hidroksitirozol radikal. Također utječe na pojedine signalne puteve, markere koji sudjeluju u upali, enzimske sustave, stanične adhezijske molekule, stanične receptore i transkripcijske faktore.

Hidroksitirozol djeluje povoljno na aterosklerozu i kardiovaskularne bolesti tako što smanjuje lipidnu peroksidaciju, sprječava oksidaciju LDL-a koji je ključni faktor u nastanku ateroma te povoljno utječe na HDL i time povećava sposobnost povrata perifernog LDL-a u jetru. Dokazano je i da povećava ekspresiju gena vezanih uz povrat kolesterola.

Glavni antitumorski mehanizam mu je autooksidacija i gomilanje vodikova peroksida. No, brojne su studije pokazale i druga antiproliferacijska i proapoptotska svojstva zbog ROS specija koje dalje aktiviraju signalne puteve i zbog utjecaja na smanjenje ekspresije receptora za epidrmalni faktor rasta (EGFR).

Neuroprotektivno djelovanje dužuje nakupljanju hidroksitirozola i hidroksitirozol sulfata u mozgu i uslijed čega se sprječava oksidativni stres na razini neurona. U slučaju Alzheimerove bolesti, povoljno djeluje na neurone tako što smanjuje toksičnost β -amiloidnih plakova, a u slučaju Parkinsonove bolesti inhibira enzimatsku i spontanu razgradnju endogenog dopamina i smanjuje porast spontane oksidacije tijekom MAO inhibicije (Karkovic Markovic i sur., 2019).



Slika 5. Kemijska struktura hidroksitirozola,
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82755>)

1.3.4. Oleuropein

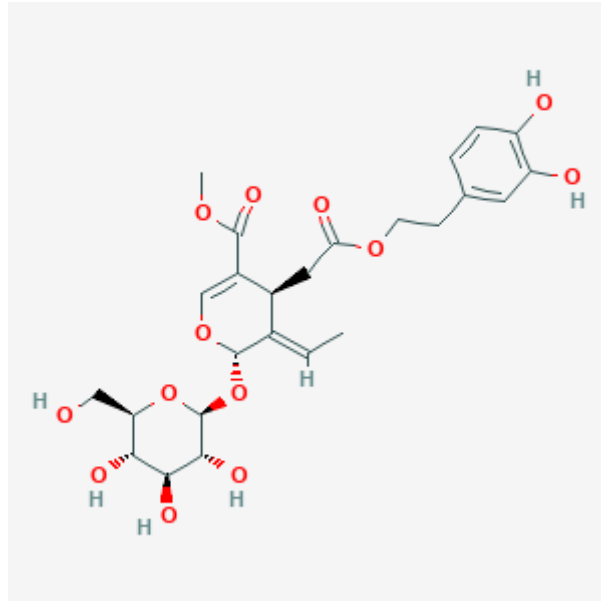
Oleuropein se ubraja u skupinu sekoiridoida (slika 6.) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281544>)

U brojnim istraživanjima dolazi do izražaja antitumorski učinak, koristan je u liječenju i prevenciji dijabetesa, pretilosti, u regulaciji razine LDL-a i kao kardioprotektiv.

Blokirajući aktivaciju endotela i adheziju monocita zahvaljujući svom antioksidativnom i protuupalnom efektu predstavlja potencijalni prirodni lijek u ranoj prevenciji ateroskleroze. Kao kardioprotektiv djeluje tako što smanjuje otpuštanje oksidiranog glutaciona, snižava trigliceride i kolesterol, povećava razinu ATP-a i time utječe na brži oporavak kod ishemijskih bolesti srca.

Kod raka dojke djeluje proapoptotski i antiproliferativno i na estrogen receptor (ER) pozitivne i na estrogen receptor (ER) negativne tumore. Isto tako, utječući na regulaciju određenih gena, djeluje i antimetastatski. In vitro ispitivanjima je ustanovljeno djelovanje protiv raka kolona, jetre, prostate, cerviksa, pankreasa, pluća i protiv leukemije i neuroblastoma.

Oleuropein ima beneficije i kao neuroprotektiv kod cerebralne ishemije i reperfuzijskih ozljeda tako što smanjuje volumen, odnosno edem mozga i apoptozu neurona na modelu miševa. Zbog svojeg antioksidativnog učinka također je povoljno djeluje na kognitivne poremećaje i oksidativni stres uzrokovan djelovanjem određenih anestetika (Karkovic Markovic i sur., 2019).



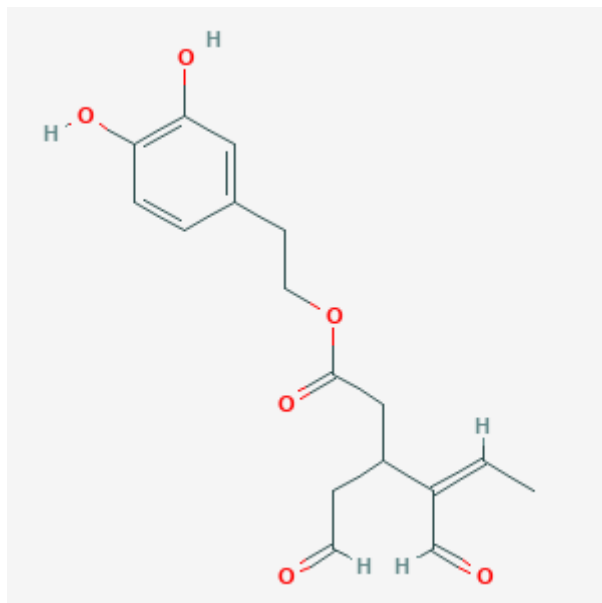
Slika 6. Kemijska struktura oleuropeina.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10393#section=Structures>)

1.3.4. Oleacein

Oleacein ili 3,4-DHPEA-EDA (3,4-dihidroksifeniletanol eleanolna kiselina) (slika 7.) se ubraja u skupinu sekoiridoida. Nalazi se u uljima te ga, osim u maslini ima i u španjolskom jasminu, *Jasminum grandiflorum*, L.
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/18684078>)

Primarno djelovanje je antioksidativno, djeluje kao hvatač slobodnih radikala, i protuupalno. U slučaju upale, utječe na neutrofile smanjujući lučenje mijeloperoksidaze (MPO) koja izaziva stvaranje perklorata, spoja odgovornog za reakcije oksidacije i kloriranja. Protuupalni efekt oleaceina može se mjeriti s efektom indometacina. Dokazan je i antimikrobni efekt, djeluje na destabilizaciju plakova krvnih žila te sprječava nakupljanje abdominalne masti kao i porast tjelesne mase (Karkovic Markovic i sur., 2019).



Slika 7. Kemijska struktura Oleaceina

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/18684078#section=2D-Structure>)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U ovom diplomskom radu istražen je fenolni profil maslinovog ulja i ploda hrvatske sorte masline Oblica i sadržaj je uspoređen s literaturnim podacima o sadržaju fenola u izabranim sortama maslina iz europskih zemalja koje su vodeće u proizvodnji maslinovog ulja. Maslinovo ulje i plod masline važan su sastavni dio prehrane u mediteranskim zemljama. Nekoliko epidemioloških studija je pokazalo da je mediteranski stil prehrane povezan s nižim rizikom morbiditeta i smrtnosti i samim time utječe na produljenje životnog vijeka (Servili M i sur., 2013.) Maslinovo ulje je predmet brojnih istraživanja koja uključuju istraživanje kemijskog sastava i njegove ljekovitosti. Posljednjih desetljeća velika pažnja posvećuje se istraživanju fenolnih spojeva pa tako i fenolnih spojeva koji su sastavni dio maslinovih ulja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijali

Pri izradi ovog rada ispitivan je plod i djevičansko maslinovo ulje (*Olea europea* L., *Oleaceae*).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura:

- ultrazvučna kupelj Transsonic T 570 (Elma, Njemačka)
- magnetna miješalica (IKA RCT basic, Njemačka)
- rotacijski uparivač Rotavapor R-200, Heating Bath B-490 (Büchi, Labortechnik AG, Švicarska)
- centrifuga Rotofix 32 (A. Hettich, D-78532 Tuttlingen, Njemačka)
- filter papiri 0.2µm/13 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka)
- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 (Hewlett Packard, Njemačka)
- HPLC DAD Series 200 system with diode array detector (DAD) (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD)

Pribor:

- tarionik s pistilom
- špatula
- tikvice s okruglim dnom
- kapalice
- epruvete

- kivete za UV-VIS
- vijalice za HPLC
- pipete, propipete
- lijevci, filter papir
- kleme, štikaljke

Kemikalije:

- Metanol za HPLC (Sigma-Aldrich, Stockholm, Švedska)
- n- heksan $\geq 99\%$ (Honeywell Burdick & Jackson, Njemačka)
- octena kiselina (ledena) 100% (Merck, Njemačka)

3.3 Metoda

3.3.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija polifenolnih spojeva je provedena različito za ulje i plod masline.

Polifenolni spojevi iz ploda ekstrahirani su prema literaturi (Jerman Klen i sur., 2010) uz određene prilagodbe. Odkošteni plod se homogenizira uz pomoć tarionika i pistila. Dobivena pasta (3.0 g) miješa se s metanolom (25 mL) na magnetskoj miješalici tijekom 5 minuta na 1300 rpm a zatim se polifenolni spojevi ekstrahiraju u ultrazvučnoj kupelji tijekom 20 minuta, 25 °C na 35 kHz pri snazi 2x35 W. Ultrazvučna ekstrakcija ponovljena je 3 puta za svaki uzorak. Metanolni ekstrakt je centrifugiran na 4000 rpm tijekom 15 min te su supernatanti kvantitativno preneseni u tikvicu s okruglim dnom i upareni. Dobiveni se sadržaj tikvice otopi u 2 mL metanola te filtrira kroz filter papir pora 0.20 μm . Filtrat je pogodan za analizu polifenolnih spojeva na HPLC-DAD uređaju.

Priprema ekstrakta polifenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja provedena je prema proceduri opisanoj u radu (Jerman Klen i sur., 2012) uz određene prilagodbe. 20.00 g djevičanskog maslinovog ulja pomiješa se s 10 mL n-heksana te se polifenolni spojevi ekstrahiraju s 15 mL metanola, pomoću ultrazvučne kupelji tijekom 20 minuta. Ultrazvučna

ekstrakcija ponovljena je 3 puta. Sadržaj je centrifugiran na 4000 rpm tijekom 15 minuta uslijed čega su se odvojili metanolni sloj s polifenolima i sloj n-heksana. Metanolni sloj se upari i zatim otopi u 2 ml metanola za HPLC- DAD analizu polifenolnih spojeva.

3.3.2. Identifikacija i kvantifikacija

Priređeni ekstrakt ploda i ulja se analizira pomoću HPLC-DAD prema zadanim uvjetima procedure (Jakobušić Brala i sur., 2015). Odvajanje na C₁₈ Restek column (5 µm, 250.4.0 mm) postiže se gradijentnom metodom na 25 °C pri brzini protoka od 1 mL/min. Ubrizga se 25 µL uzorka uz protok mobilna faze (A): voda-octena kiselina (98:2, v/v) i mobilne faze (B): metanol tijekom 60 min. Promjena sastava mobilne faze odvija se po sljedećoj shemi: 95% A-5% 2 min, 75% A-25% B 8 min, 60% A-40% B 10 min, 50% A-50% B 10 min, i 0% A-100% B do kraja protoka mobilne faze. Apsorbancija eluata mjerena je na 278 nm.

Tablica 1. Jednadžbe kalibracijskih krivulja za standarde tirozol, hidoksitirozol i oleuropein s retencijskim vremenima (R_t) određenima HPLC-DAD analizom.

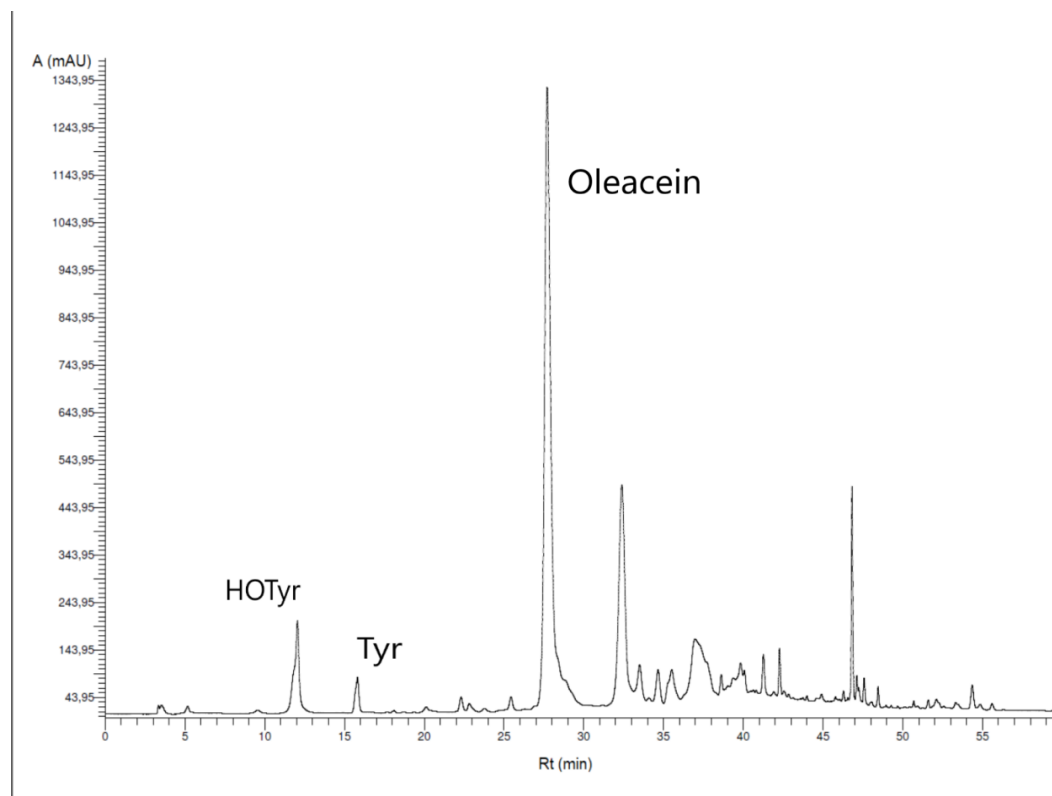
Standard	R_t / min	Jednadžba pravca*
Tirozol	12,02	$y=14049,60x-168156,00$ $R^2=0,9989$
Hidoksitirozol	15,66	$y=19392,10x-230815,00$ $R^2=0,9980$
Oleuropein	30,20	$y=10475,42x-1078639,00$ $R^2=0,9844$

- Rezultati preuzeti od Jelena Torić, disertacija u pripremi

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ULJE

Kromatogram ulja masline na valnoj duljini od 278 nm prikazan je na slici 8. Fenolni spojevi identificirani na temelju usporedbe retencijskih vremena pikova iz kromatograma uzoraka s retencijskim vremenima standarda. Na temelju kalibracijskih pravaca za tirozol, hidroksitirozol i oleuropein izračunate su koncentracije fenolnih spojeva u uzorcima ulja i izraženi u mg po kg ulja. Rezultati su prikazani u tablici 2.



Slika 8. Kromatogram uzorka ulja masline *Olea europea* L. kultivara Oblica na valnoj duljini od 278 nm.

Tablica 2. Sadržaj polifenola eksperimentalno određen u ulju masline *Olea europea* L. kultivara Oblica i usporedba s literaturnim vrijednostima za talijanska ulja pokrajine Lazio s obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva (OPG) i pokrajine Umbria zaštićene izvornosti (Antonini i sur., 2015) i španjolsko ulje pokrajine Galija (Reboredo-Rodríguez i sur., 2016)

Fenolni spoj	Koncentracija (mg/kg±SD)			
	Oblica	Umbria	Lazio	Galija
Hidroksitirozol	20,6 ± 0,3	0,98 ± 0,01	3,70 ± 0,10	11,2 ± 0,2
Tirozol	8,36 ± 0,11	3,00 ± 0,15	4,70 ± 0,40	24,1 ± 0,0
Oleacein	304 ± 17	196 ± 16	250 ± 12	112 ± 9

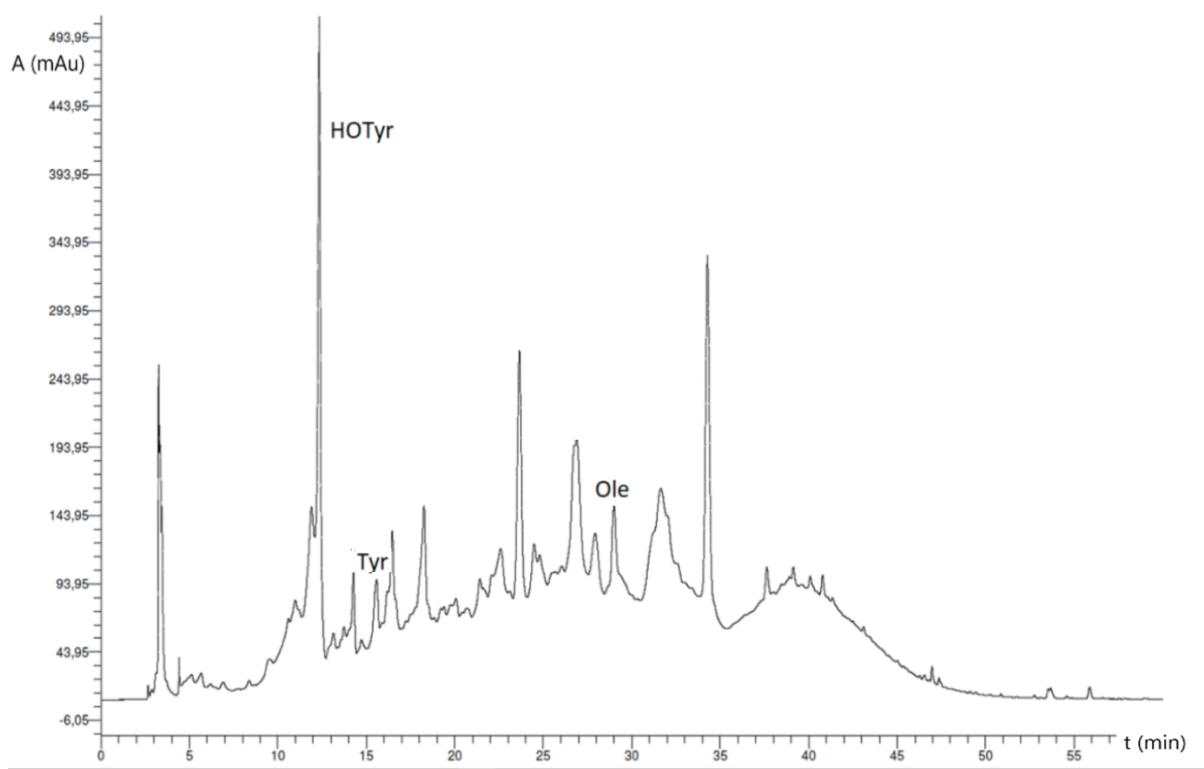
U tablici 2. prikazan je eksperimentalno određeni sadržaj fenola u ulju i uspoređen s literaturom, odnosno uljima drugih zemalja. Iz Italije je uzeto u obzir umbrijsko ulje zaštićene izvornosti proizvedeno od kultivara Frantoio i Leccino i ulje iz pokrajine Lazio s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava (OPG) proizvedeno od 64 različita kultivara (Antonini i sur., 2015). Hrvatsko je ulje uspoređeno i sa španjolskim uljem iz Galije proizvedeno od kultivara Brava (70%) i Mansa (30%) (Reboredo-Rodríguez i sur., 2016).

Usporedba polifenola u ulju pokazuje najveći sadržaj hidroksitirozola u ulju kultivara Oblice, čak 20 puta u odnosu na talijansko ulje zaštićene izvornosti iz Umbrije, oko 5 puta više u odnosu na ulje s obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva u Laziju, i gotovo dvostruko više u odnosu na španjolsko ulje iz Galije. Sadržaj tirozola veći je u odnosu na talijanska ulja, dok je španjolsko ulje skoro 3 puta bogatije tirozolum. Sadržaj oleaceina najveći je u ispitivanom uzorku ulja kultivara Oblice.

U usporedbi istraživanih polifenola u ulju, Oblica je superiornija odnosu na talijanska ulja pokrajina Lazio i Umbria, a sličnih parametara kao španjolsko ulje iz Galije.

4.2. PLOD

Analiza ekstrakta ploda masline *Olea europea* L. kultivara Oblica provedena je pod istim uvjetima kao i za ulje. Dobiveni kromatogram HPLC-DAD analize prikazan je na Slici 9. dok su koncentracije biomedicinski važnih polifenolnih spojeva prikazani u tablici 3.



Slika 9. Kromatogram uzorka ploda masline *Olea europea* L. kultivara Oblica

Tablica 3. Sadržaj polifenola eksperimentalno određenih u plodu masline *Olea europea* L. i usporedba s literaturnim vrijednostima za toskanske kultivare Ciliegino i Rossellino (Romani i sur., 1999) i grčki kultivar Conservolea (Blecas i sur., 2001)

Fenolni spoj	Konzentracija polifenola u plodu (mg/kg±SD)			
	Oblica	Ciliegino	Rossellino	Conservolea
Hidroksitirozol	215 ± 1	567 ± 28	4133 ± 41	219 ± 9
Tirozol	60,9 ± 0,5	101 ± 2	413 ± 14	41,0 ± 2,0
Oleuropein	272 ± 2	2406 ± 68	35.8 ± 0.1	-

U tablici 3. za usporedbu s eksperimentalno određenim vrijednostima važnih fenolnih spojeva uzete su obzir vrijednosti iz literaturnih podataka za toskanske kultivare Ciliegino i Rossellino (Romani i sur., 1999) i grčki kultivar Conservolea (Blecas i sur., 2001).

Sadržaj hidroksitirozola u plodu kultivara Oblice manji je odnosu na druge plodove. U odnosu na toskanski kultivar Ciliegino 6 puta, a u odnosu na Rossellino gotovo 20 puta. Grčki kultivar Conservolea neznatno je bogatiji hidroksitirozolum. Sadržaj tirozola veći je u odnosu na grčki kultivar, a manji u odnosu na toskanske kultivare. Po pitanju sadržaja polifenola u plodu, Oblica je inferiornija u odnosu na toskanske sorte, a sličnih parametara kao grčki kultivar Conservolea. Kultivar oblica je u zlatnoj sredini s koncentracijom oleuropeina, oko 8 puta ga je više nego li u toskanskom kultivaru Rossellino, a 9 puta manje nego li u toskanskom kultivaru Ciliegino. Rezultati oleuropeina za grčki kultivar Conservolea nisu signifikantni.

4.3.USPOREDBA SADRŽAJA FENOLA U ULJU I PLODU KULTIVARA

OBLICA

Budući da su se u eksperimentalno ispitivanje uzimali uzorci i ploda i ulja istog kultivara masline Oblica iz iste berbe, interesantno je proučiti odnos sadržaja polifenola u ulju i plodu. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Usporedba sadržaja polifenola u ulju i plodu masline *Olea europea* L. kultivara Oblica.

Fenolni spoj	Koncentracija (mg/kg±SD)	
	ulje	plod
Hidroksitirozol	20,6 ± 0,3	215 ± 1
Tirozol	8,36 ± 0,11	60,9 ± 0,5
Oleuropein	-	272 ± 2
Oleacein	304 ± 17	-

Iz eksperimentalnih podataka vidljivo je da je osjetno veća količina polifenola prisutna u kilogramu ploda nego li ulja. Maslinovo je ulje po sastavu 90-99% lipofilna frakcija, a plod 50% voda i 22% ulje. S obzirom da su hidroksitirozol i tirozol hidrofilne molekule (Karkovic Markovic i sur., 2019) rezultat je i očekivan zbog tehnološkog procesa priprave ulja i gubitka polifenola u otpadnoj vodi.

Naime, proces proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja podrazumijeva mehaničku ekstrakciju za razliku od drugih ulja koja prethodno moraju biti rafinirana (primjerice suncokretovo) (Frankel i sur., 2013). Mljevenje i prešanje su procesi u kojima se može izgubiti najviše fenolnih spojeva (<https://www.baldasar.hr/clanci/item/opis-tehnoloskog-procesa-proizvodnje-maslinovog-ulja.html>). Tijekom oba procesa aktiviraju se enzimi koji razgrađuju fenolne spojeve, a tijekom prešanja se još dodatno smanjuje njihov sadržaj zbog

gubitka vodene faze bogata fenolnim spojevima. Imajući na umu biološki značaj fenolnih spojeva, optimizacija njihove ekstrakcije predstavlja veliki izazov industriji proizvodnje ulja (Frankel i sur., 2013).

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskoga rada određen je fenolni profil najvažnijih fenolnih spojeva u ulju i plodu masline vrste *Olea europea* L. (maslina), kultivara Oblica. Određeni su biomedicinski važni tirozol, hidroksitirozol, oleacein i oleuropein. Identifikacija fenolnih spojeva i određivanje njihovog sadržaja provedena je HPLC- DAD analizom na 278 nm.

Ulje masline sadrži $20,6 \pm 0,3$ mg/kg ulja hidroksitirozola, $8,36 \pm 0,11$ mg/kg ulja tirozola i 304 ± 17 mg/kg ulja oleaceina, a plod 215 ± 1 mg/kg ploda hidroksitirozola, $61 \pm 0,5$ mg/kg ploda tirozola i 272 ± 2 mg/kg ploda oleuropeina. Plod, zbog svog hidrofiličnijeg karaktera sadrži veći postotak hidrofiličnih fenolnih spojeva nego li ulje.

Ovim sastavom, ulje i plod kultivara Oblica usporedivo je s uljima iz drugih država koje spadaju u važnije proizvođače maslinovog ulja.

6. LITERATURA

Antonini E, Farina A, Leone A, Mazzara E, Urbani S, Selvaggini R, Servili M, Ninfali P. Phenolic compounds and quality parameters of family farming versus protected designation of origin (PDO) extra-virgin olive oils. *J Food Compos. Anal*, 2015 43, 75–81.

Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.

Blekas G, Vassilakis C, Harizanis C, Tsimidou M, Boskou D. G. Biophenols in Table Olives. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(13), 3688–3692.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998, 56, 317-333.

Flora Croatica database, <https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/Delta/Description>, pristupljeno 20.8.2019.

Frankel E, Bakhouché A, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(22), 5179–5188.

Ghanbari R, Anwar F., Alkharfy K., Gilani A., and Saari N. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). *Int J Mol Sci*. 2012; 13(3): 3291–3340.

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Capello 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.

Hidroksitirozol, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82755>, pristupljeno 31.7.2019.

Jerman Klen T, Mozetič Vodopivec B. Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food Chem*, 2012, 15;134(4):2481-8.

Jerman Klen T, Mozetič Vodopivec B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem*, 2010, 123(1):175-182.

Jakobušić Brala C, Benčić Đ, Šindrak Z, Barbarić M Uršić S. Labeled extra virgin olive oil as food supplement; phenolic compounds in oils from some autochthonous Croatian olives.

Grasas y Aceite, 2015, 66(4):e099

Karković Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 2019, 24(10), 2001.

Maslina, <http://www.agroledina.hr/maslina.php>, pristupljeno 22.8.2019.

Olea Article, <https://en.wikipedia.org/wiki/Olea>, pristupljeno 20.8.2019.

Oleuropein, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281544>, pristupljeno 1.9.2019.

Oleacein, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/18684078#section=2D-Structure>, pristupljeno 1.9.2019.

Opis tehnološkog procesa proizvodnje maslinovog ulja,

<https://www.baldasar.hr/clanci/item/opis-tehnoloskog-procesa-proizvodnje-maslinovog-ulja.html>, pristupljeno 16.9.2019.

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

Presjek ploda masline, [https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-](https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780123744203001455-gr1.jpg)

[B9780123744203001455-gr1.jpg](https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780123744203001455-gr1.jpg), pristupljeno 5.9.2019.

Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2866-2887

Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Valli E, Bendini A, Gallina Toschi T, Simal-Gandara, J. Characterization of virgin olive oils produced with autochthonous Galician varieties. *Food Chem*, 2016, 212, 162–171.

Romani A, Mulinacci N, Pinelli P, Vincieri F. F, Cimato A. Polyphenolic Content in Five Tuscany Cultivars of *Olea europaea* L. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(3), 964–967.

Servili M, Sordini B, Esposito S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 2013, 3(1), 1–23.

Sorte masline, <http://www.oleacult.com/hr/footer/hrvatske-maslinarske-sorte-2>, pristupljeno 22.8.2019.

Stablo masline, https://www.np-brijuni.hr/imagecache/maxsize/6f67e492-4a50-4136-93fd-89f06287a549/28-02-2019/img_1771.jpg, pristupljeno 3.9.2019.

Tirozol, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10393#section=Structures>, pristupljeno 29.7.2019.

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 Revs*, 2005, 18, 98–112.

Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem*. 2002 Nov;13(11):636-644.

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

7. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovog rada bio je određivanje biomedicinski važnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju i plodu masline kultivara Oblica. Nakon ekstrakcije, provedena je HPLC-DAD analiza uzoraka na valnoj duljini od 278 nm te su utvrđene koncentracije fenolnih spojeva u ulju masline: 20,6 mg/kg ulja hidroksitirozola, 8,36 mg/kg ulja tirozola i 304 mg/kg ulja oleaceina, U plodu masline određene su koncentracije 215 mg/kg ploda hidroksitirozola, 61 mg/kg ploda tirozola i 272 mg/kg ploda oleuropeina.

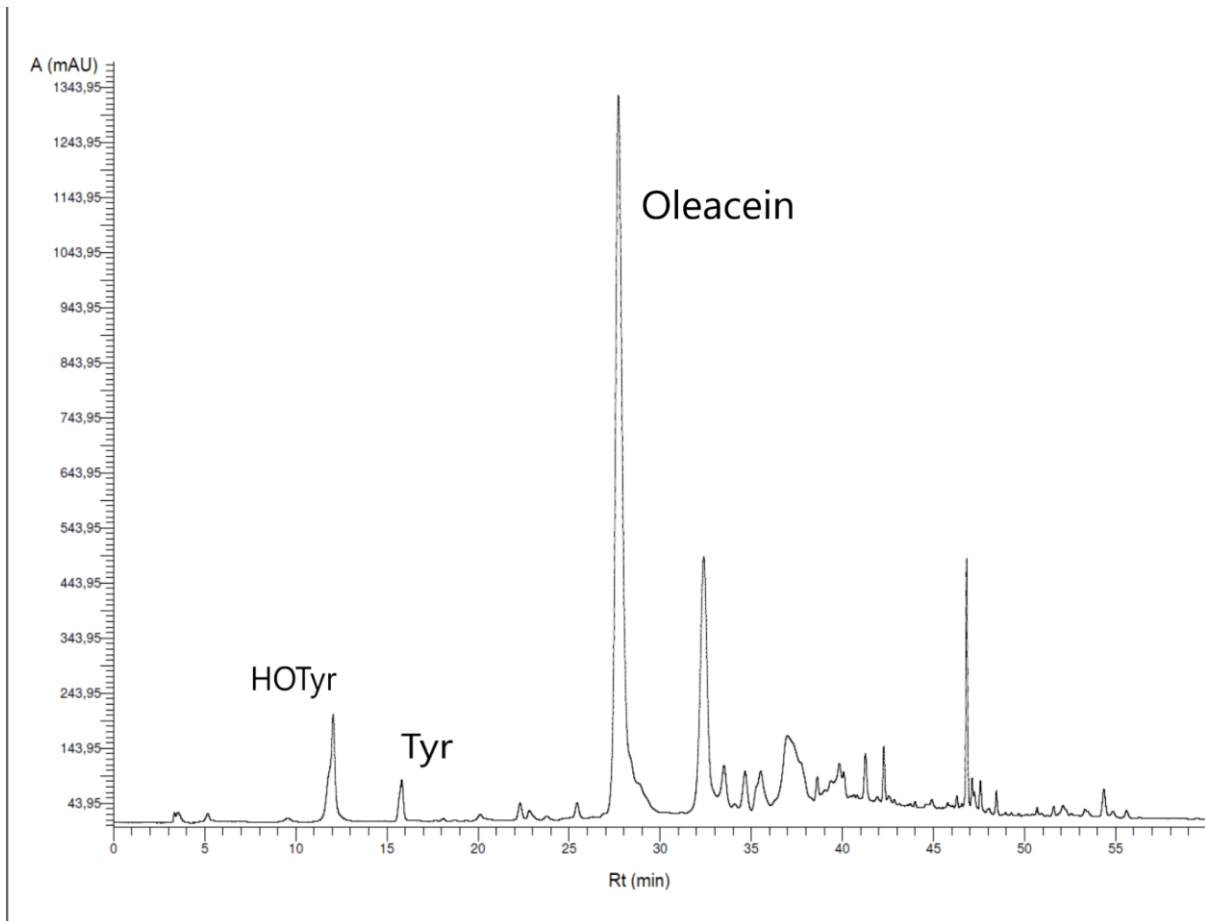
Prisutnost ovih polifenola u ulju i plodu masline ukazuje na prednosti mediteranske prehrane za ljudsko zdravlje i nudi potencijalna farmakološka rješenja u smjeru antioksidativnog, protuupalnog i antitumorskog učinka.

SUMMARY

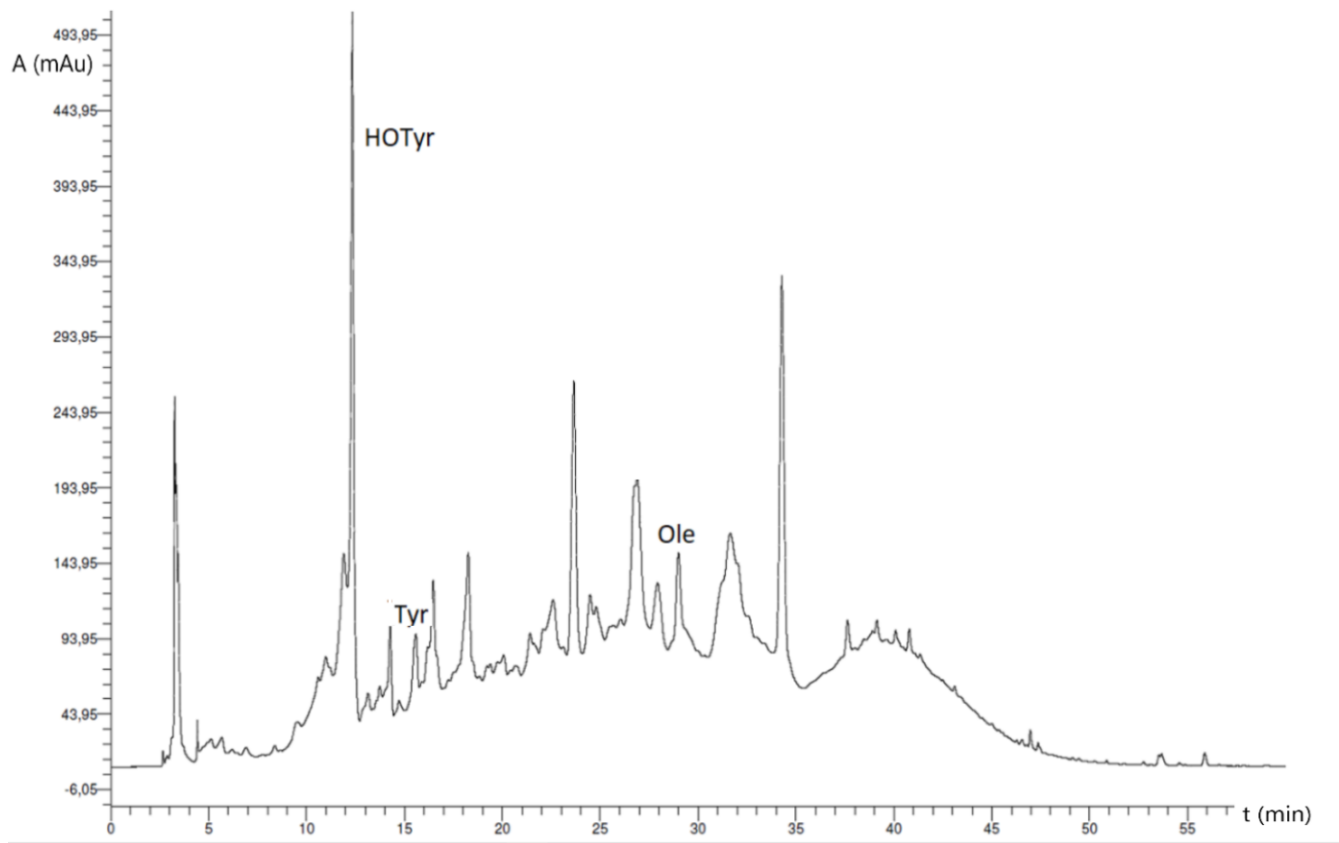
The aim of this work was quantitative analysis of biomedically important phenolic compounds in olive oil and fruit in Croatian cultivar Oblica. After extraction, HPLC-DAD analysis was carried out with the absorption of eluates detected on 278 nm with following results: 20,6 mg hydroxytyrosol, 8,36 mg tyrosol and 304 oleacein per kg of oil and 215 mg hydroxytyrosol, 60,9 mg tyrosol and 272 mg of oleuropein per kg of fruit.

Presence of these polyphenols with various biological properties emphasizes the advantages of Mediterranean diet. In addition, it offers new pharmacological possibilities due to its antioxidative, anti-inflammatory and anticancer effects.

8. PRILOZI



Prilog 1. Kromatogram uzorka ulja masline *Olea europea* L. kultivara Oblica



Prilog 2. Kromatogram uzorka ploda masline *Olea europea* L. kultivara Oblica

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Studij: Farmacija

Zavod za farmaceutsku kemiju

Kovačićeve 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

ODREĐIVANJE BIOMEDICINSKI VAŽNIH FENOLNIH SPOJEVA U MASLINOVOM ULJU I PLODU MASLINE

Karla Komšić

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je određivanje biomedicinski važnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju i plodu masline kultivara Oblica. Nakon ekstrakcije, provedena je HPLC-DAD analiza uzoraka na valnoj duljini od 278 nm te su utvrđene koncentracije fenolnih spojeva u ulju masline: 20,6 mg/kg ulja hidroksitirozola, 8,36 mg/kg ulja tirozola i 304 mg/kg ulja oleaceina. U plodu masline određene su koncentracije 215 mg/kg ploda hidroksitirozola, 61 mg/kg ploda tirozola i 272 mg/kg ploda oleuropeina.

Prisutnost ovih polifenola u ulju i plodu masline ukazuje na prednosti mediteranske prehrane za ljudsko zdravlje i nudi potencijalna farmakološka rješenja u smjeru antioksidativnog, protuupalnog i antitumorskog učinka.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 8 grafičkih prikaza, 4 tablice i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ulje masline, plod masline, polifenoli

Mentor: **Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Ana Karković Marković**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ana Karković Marković, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Study: Pharmacy

Department of pharmaceutical chemistry

Kovačićeva 1, 10000 Zagreb, Croatia

DETERMINATION OF BIOMEDICALLY IMPORTANT PHENOLIC COMPOUNDS IN OLIVE OIL AND FRUIT

Karla Komšić

SUMMARY

The aim of this work was quantitative analysis of biomedically important phenolic compounds in olive oil and fruit in Croatian cultivar Oblica. After extraction, HPLC-DAD analysis was carried out with the absorption of eluates detected on 278 nm with following results: 20,6 mg hydroxytyrosol, 8,36 mg tyrosol and 304 oleacein per kg of oil and 215 mg hydroxytyrosol, 60,9 mg tyrosol and 272 mg of oleuropein per kg of fruit.

Presence of these polyphenols with various biological properties emphasizes the advantages of Mediterranean diet. In addition, it offers new pharmacological possibilities due to its antioxidative, anti-inflammatory and anticancer effects.

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

Thesis includes: 34 pages, 8 figures, 4 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive oil, olive fruit, polyphenoles

Mentor: **Monika Barbarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Comentor: **Ana Karković Marković, Ph.D.** Research Associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

The thesis was accepted: September 2019

