

UV-Vis i NMR analiza polifenolnih sastavnica maslinovih ulja

Križanić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:123862>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Križanić

**UV-Vis i NMR analiza polifenolnih sastavnica
maslinovih ulja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.godina

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

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Cvijeti Jakobušić Brala i komentorici izv. Prof. Moniki Barbarić na stručnom vodstvu, strpljenu, pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvalna sam na brojnim prijateljima koji su mi uljepšali dane studiranja kao i na njihovoj podršci.

Posebno zahvaljujem svom dečku koji me ohrabrivao kad god bi vidio da posustajem.

Najveća zahvala ide mojoj obitelji na razumijevanju, strpljenju i bezuvjetnoj ljubavi.

POPIS KRATICA

ACN	Acetonitril
APCI	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (<i>Atmospheric pressure chemical ionisation</i>)
API	Ionizacija pri atmosferskom tlaku (<i>Atmospheric pressure ionisation</i>)
CE	Kapilarna elektroforeza (<i>Capillary electrophoresis</i>)
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ER	Estrogenski receptori
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem (<i>Electrospray ionisation</i>)
F-C	Folin-Ciocalteu
GC	Plinska kromatografija (<i>Gas chromatography</i>)
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (<i>High performance liquid Chromatography</i>)
IUPAC	Internacionalna unija za čistu i primjenjenu kemiju (<i>The International union of Pure and Applied chemistry</i>)
LC	Tekućinska kromatografija (<i>Liquid chromatography</i>)
LDL	Lipoproteini niske gustoće (<i>Low density lipoproteins</i>)
LOD	Limit detekcije (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limit kvantifikacije (<i>Limit of quantification</i>)
MS	Masena spektrofotometrija (<i>Mass spectrophotometry</i>)
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija
ROS	Reaktivni kisikovi spojevi (<i>Reactive oxygen species</i>)
SPE	Ekstrakcija na čvrstoj fazi (<i>Solid phase extraction</i>)
TOF	Analizator vremena preleta (<i>Time of flight</i>)
UHPLC	Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 POLIFENOLI MASLINOVOG ULJA	1
1.1.1. Sastav i podjela.....	2
1.1.2. Najvažniji biološki učinci polifenola	5
1.2. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA U MASLINOVIM ULJIMA	8
1.2.2. UV-Vis spektroskopija	8
1.2.3. Kapilarna elektroforeza	9
1.2.4. Tekućinska kromatografija.....	10
1.2.5. Plinska kromatografija	11
1.3. ANALIZA MASLINOVIH ULJA PRIMJENOM NMR SPEKTROSKOPIJE ...	12
1.3.1. NMR spektroskopija	12
1.3.2. Analiza maslinovog ulja ¹ H NMR spektroskopijom.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Uzorci maslinovog ulja	16
3.2. METODE	16
3.2.1. Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja metodom	16
3.2.2. Priprema otopina reagensa za UV-Vis analizu polifenola u maslinovom ulju	17
3.2.3. Priprema uzoraka za UV-Vis analizu	18
3.2.4. UV-Vis spektrofotometrijske analize polifenola u maslinovom ulju.....	18
3.2.5. ¹ H NMR spektrofotometrijska analiza polifenolnog ekstrakta maslinovog ulja...	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE	24
4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenola.....	24
4.1.2. Sadržaj ukupnih flavonoida.....	28
4.1.3. Sadržaj <i>o</i> -difenola	30
4.2. ¹H NMR SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE	34
4.2.1. Sadržaj S-(E)-elenolida, oleokoronala i oleomisionala.....	34
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38
7.SAŽETAK/SUMMARY	42
7.1. Sažetak	42
7.2. Summary	43

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1 POLIFENOLI MASLINOVOG ULJA

Maslinova ulja, posebice ekstra djevičanska maslinova ulja, glavni su izvor masnoća u mediteranskoj prehrani koja se povezuje s rjeđom incidencijom kroničnih upalnih bolesti (npr. bolesti kardiovaskularnog sustava, neurodegenerativnih bolesti), karcinoma kao i duljim životnim vijekom. Ona su, stoga, posljednjih nekoliko desetljeća tema mnogih istraživanja i kliničkih studija koja su dokazala njihov antioksidativni učinak kao i određena farmakološka svojstva za koja su prije svega odgovorne polifenolna sastavnice (Pérez-Cano i sur., 2016).

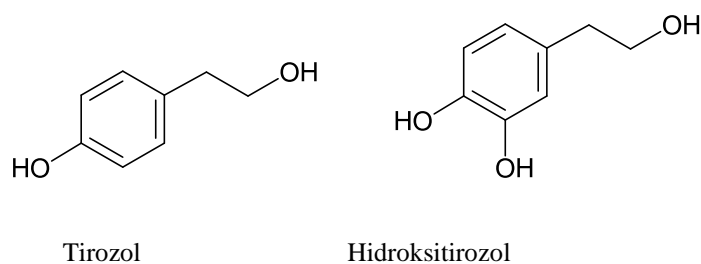
Djevičansko maslinovo ulje dobiva se iz zrelih plodova masline (*Olea Europea L.*) hladnim prešanjem ili drugim mehaničkim postupcima. Takvim su postupkom očuvani svi prirodno prisutni sastojci odgovorni za prepoznatljiva organoleptička svojstva ulja (Gorzynik-Debicka i sur., 2018). Sastavnice ulja mogu se podijeliti na dvije glavne frakcije, osapunjivu i neosapunjivu. Poznato je da osapunjiva frakcija čini gotovo 98 % sadržaja, a sastoji se od triglicerida, di i monoglicerida, slobodnih masnih kiselina i fosfatida. U manju, neosapunjivu, frakciju ubrajamo fitosterole, skvalene, tokoferole, pigmente, karotenoide, alifatske i triterpenske alkohole, triterpenske kiseline, hlapljive spojeve i polifenole (Serreli i Deiana, 2018). U literaturi se fenolna frakcija često navodi kao polifenolna te je za razliku od ostalih sastavnica neosapunjive frakcije hidrofilna (Tripoli i sur., 2005). Na polifenolni sastav utječe više faktora. To su sorta masline, klimatsko područje, način uzgoja, stupanj zrelosti ploda te proces proizvodnje maslinovog ulja. (Serreli i Deiana, 2018). Dosad je identificirano više od 30 fenolnih spojeva u ekstra djevičanskim maslinovim uljima, međutim ne nalazimo ih sve u svakom ulju. Polifenolima se pripisuju antioksidativno, antikarcinogeno, protuupalno, antimikrobno djelovanje potvrđeno kako *in vitro* tako i *in vivo* ispitivanjima. Antioksidativno djelovanje pridonosi i povećanoj stabilnosti maslinovih ulja. Sadržaj polifenola u prirodnim, naročito ekstra djevičanskim uljima je izrazito visok te varira od 50 do preko 1000 mg/kg.

1.1.1. Sastav i podjela

Polifenoli nastaju kao sekundarni metaboliti biljaka (nisu nužni za rast, razvoj, ramnožavanje) i čine jednu od najvećih skupina kemijskih spojeva poznatih u biljnom svijetu. Budući da je riječ o vrlo heterogenoj skupini spojeva ne čudi kako je dosad otkriveno preko 8000 spojeva. Više od polovice njih čine flavonoidi (Pérez-Cano i sur., 2016). Polifenoli biljkama služe kao zaštita od biljojeda, patogena, ultraljubičastog zračenja ili kao molekule kemijskih signalnih putova. Zajednička strukturna karakteristika fenolnih spojeva je prisutnost jedne ili više aromatskih jezgri s jednom ili više hidroksilnih skupina (Miloš i sur.,ured., 2017). Polifenole ekstra djevičanskih maslinovih ulja možemo podijeliti u 6 glavnih skupina: fenolne kiseline, fenolne alkohole, sekoiridioide, lignane, flavonoide te hidroksiizokromane.

Fenolne kiseline su prvi otkriveni fenolni spojevi maslinovog ulja, a dijele se na derivate hidroksicimetne i derivate *p*-hidroksibenzojeve kiseline (Serreli i Deiana., 2018), dok se u nekim maslinovim uljima mogu naći i derivati feniloctene kiseline (Bendini i sur., 2007a). Neke od njih su vanilinska, galna, *p*-aminobenzojeva, kavena, siringična, ferulična, kumarinska, cimetna kiselina i dr.

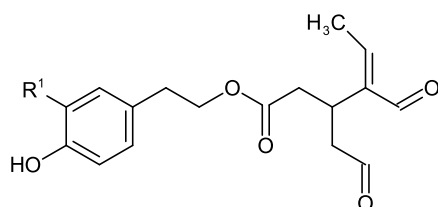
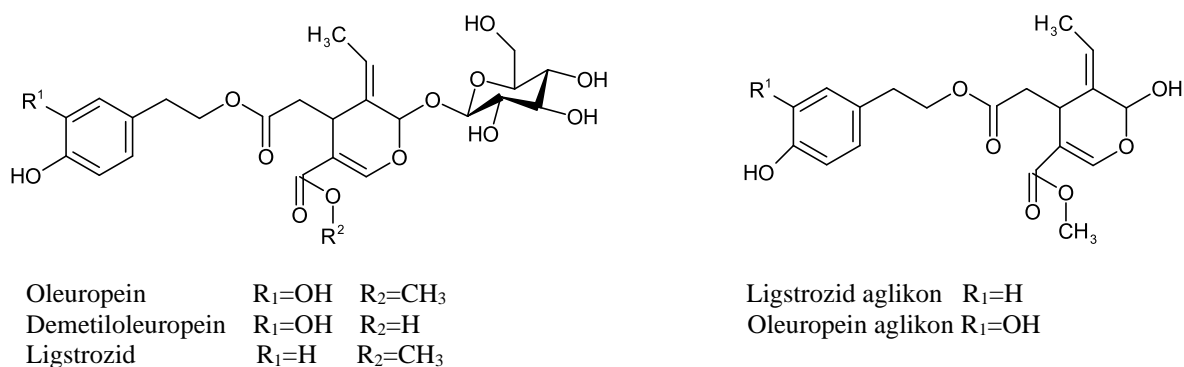
U fenolne alkohole ubrajamo hidroksitirozol te tirozol, a karakterizira ih -OH skupina vezana na alkilni lanac. Njihov sadržaj tijekom čuvanja ulja raste kao posljedica hidrolize sekoiridoida.



Slika 1. Strukture tirozola i hidroksitirozola.

Sekoiridoidi su skupina spojeva koju nalazimo samo u biljkama *Oleaceae* porodice (Bendini i sur., 2007a). Karakterizira ih prisutnost elenolne kiseline ili njenih derivata u strukturi (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005). Najbrojnija su skupina spojeva fenolne frakcije maslinovog ulja te zajedno s fenolnim alkoholima (tirozol, hidroksitirozol) čine gotovo 90% fenolnog sadržaja. Najzastupljeniji sekoiridoidni spojevi u košticama masline su oleuropein i ligstrozid koji prilikom proizvodnje ekstra djevičanskih maslinovih ulja prelaze u ligstrozid i

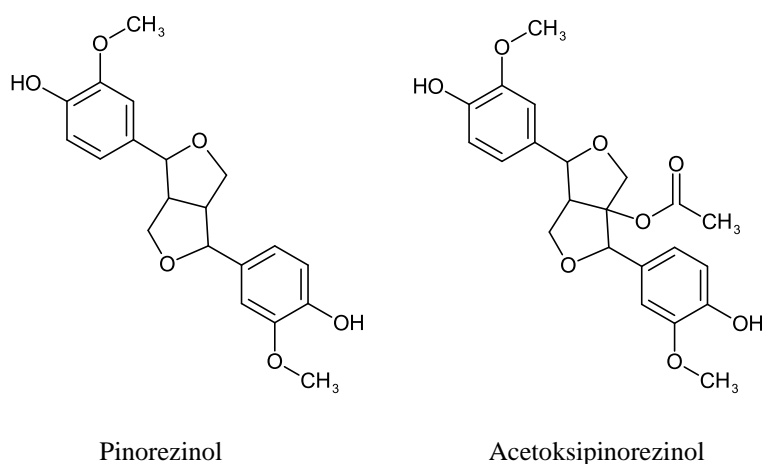
oleuropein aglikone. Drugi značajni spojevi su oleacein i oleokantal . Moguće je naći mono- i dialdehidne oblike ovih aglikona te otvorene i zatvorene oblike oleokantala i oleaceina.



Oleacein R₁=OH
Oleokantal R₁=H

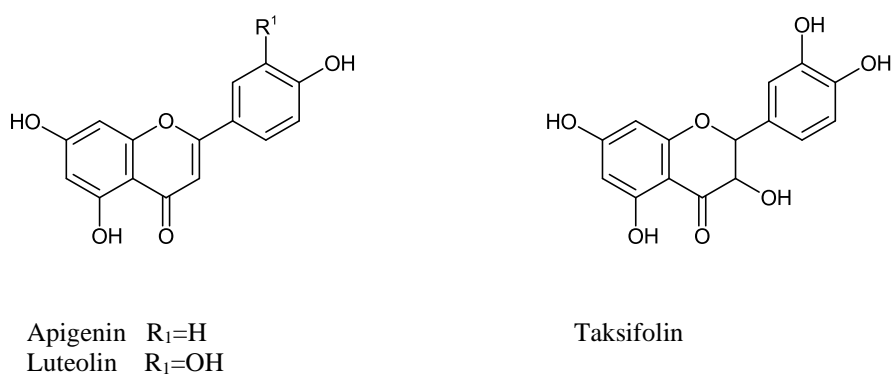
Slika 2. Sekoiridoidi maslinovih ulja.

Lignani su uz sekoiridoide prevladavajuća skupina polifenola u maslinovom ulju (Bendini i sur., 2007a). Prema IUPAC-u to su dimerne C₆C₃ jedinice koje su povezane preko 8, 8' ugljikovih atoma. Riječ je o kiralno aktivnim spojevima. U maslinovim uljima prvenstveno nalazimo (+)-1-acetoksinorezinol i (+)-1-pinorezinol.



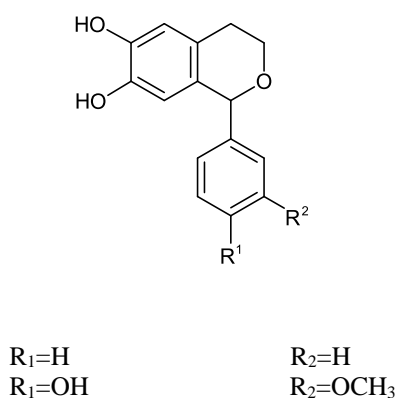
Slika 3. Lignani maslinovog ulja.

Flavonoidi su skupina spojeva čiji su benzenski prstenovi povezani linearnim C₃ lancem. Poglavitito se radi o planarnim strukturama. U biljkama ih većinom nalazimo u formi glikozida dok su druge moguće modifikacije hidroksilacija, prenilacija i metoksilacija. Modifikacije su moguće na svakom prstenu što flavonoide čini najvećom podskupinom polifenola. Klasificiraju se u flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, flavanole te antocijanidine (Pérez-Cano i sur., 2016). Kao glavni flavoni maslinovog ulja ističu se luteolin i apigenin, dok je u nekim uljima nađen i flavonol (+)-taksifolin (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005).



Slika 4. Flavonoidi maslinovog ulja.

Hidroksiizokromani su malena skupina koju čine dva spoja, 1-fenil-6,7-dihidroksi-izokroman i 1-(3'-metoksi- 4'-hidroksi) – 6,7-dihidroksi -izokroman. U maslinovim uljima nalaze se u vrlo malim količinama.



Slika 5. Hidroksiizokromani maslinovog ulja.

1.1.2. Najvažniji biološki učinci polifenola

Posljednjih godina sve je veći broj *in vitro* i *in vivo* ispitivanja bioloških učinaka polifenolnih spojeva. Iako je njihov mehanizam djelovanja višestruk, prvenstveno je vezan za antioksidativnu aktivnost. Polifenoli tako smanjuju koncentraciju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u ljudskom tijelu. Antioksidativna aktivnost fenola povezana je s njihovom strukturom pa tako *o*-dihidroksi spojevi (*o*-difenoli) imaju veći antioksidativni kapacitet naspram hidroksi spojeva. Smatra se i da je za antimikrobni učinak polifenola odgovorna prisutnost upravo *o*-dihidroksi sustava (Tripoli i sur., 2005). Osim antioksidativne aktivnosti, polifenoli imaju i druge pozitivne učinke na zdravlje. Oni uključuju protuupalne, anti-alergijske, antiaterogene, antitrombotske te anti-mutagene učinke. Određena ispitivanja pokazuju i imunomodulatorne učinke polifenolnih spojeva (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

Polifenoli imaju glavnu ulogu u mnogobrojnim pozitivnim (biološkim) učincima konzumacije maslinovog ulja. Tome u prilog ide činjenica da mnoge studije pokazuju da su maslinova ulja, bogata fenolima, učinkovitija u odnosu na sjemena ulja kao i maslinova ulja koja su siromašna polifenolima. To se očituje u smanjenju kardiovaskularnih rizičnih faktora kao što su smanjena koncentracija LDL-a u plazmi, poboljšana endotelna funkcija i smanjena učestalost protrombotičkih uvjeta (Romani i sur., 2019.). Europska komisija je 16. svibnja 2012. u uredbi broj 432/2012, koja definira listu dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, nakon godina rasprava navela prvu tvrdnju koja se odnosi na maslinova ulja. Ona glasi: „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa.“ Ova se tvrdnja odnosi na ona maslinova ulja koja sadrže minimalno 5 mg hidroksitirozola i njegovih derivata (oleuropein, tirozol i dr.) na 20 g ulja. Također je istaknuto da se koristan učinak osigurava dnevnim unosom od 20 g maslinovog ulja (www.eur-lex.europa.eu).

Kao i drugi spojevi uneseni hranom, apsorbirani polifenoli podložni su metabolizmu koji najčešće podrazumijeva glukuronidaciju, metilaciju, sulfokonjugaciju ili hidrolizu. Dakle, nađeni su poglavito kao metaboliti druge faze. Primijećeno je da su sekoiridoidni aglikoni u normalnim gastričnim uvjetima podložni hidrolizi pri čemu se oslobađaju velike količine tirozola i hidroksitirozola već nakon 30 minuta. S druge strane glikozilirani oblici sekoiridoida nisu podložni ovoj vrsti hidrolize pa zajedno s većim količinama tirozola i hidroksitirozola dopijevaju do tankog crijeva koje je ujedno i mjesto njihove najveće apsorpcije. Nema usuglašenog stava o tome umanjuje li metabolizam njihov biološki učinak u organizmu budući da postoje oprečni rezultati studija. Prema studijama bioraspoloživosti, koncentracija metabolita u tjelesnim tkivima i tekućinama je veća u odnosu na koncentraciju apsorbiranih

spojeva. Stoga je vrlo vjerojatno da metaboliti doprinose pozitivnim učincima na zdravlje povezanih s konzumacijom maslinovih ulja (Serreli i Deiana, 2018).

1.1.2.1. Biološki učinci flavonoida

Antioksidativna aktivnost flavonoida, poznata već više od 40 godina, proizlazi iz njihove polifenolne kemijske strukture, a temelji se na sposobnosti suzbijanja štetnog učinka slobodnih radikala na organizam. Zaštitni učinak protiv raka, kardiovaskularnih bolesti, gastrointestinalnih promjena kao i nekih bolesti živčanog sustava još su neki od bioloških učinaka ove skupine spojeva (Pérez-Cano i sur., 2016). U maslinama i maslinovim uljima, nalazimo apigenin, luteolin, kvercetin i rutin, a njihov se udio razlikuje ovisno o sorti masline kao i o stupnju sazrijevanja.

Od svih flavonoida, apigenin je jedan od najrasprostranjenijih u biljnom svijetu, a ujedno i jedan od najistraživanijih spojeva. Zbog svojih svojstava mogao bi biti koristan terapeutik u liječenju upalnih, autoimunih, neurodegenerativnih bolesti pa čak i nekih vrsta raka. Intrizična toksičnost na normalne stanice je mnogo niža naspram raznih malignih u usporedbi sa strukturno sličnim flavonoidima. Uz apigenin, rutin, kvercetin i neki drugi flavonoidi imaju određene antivirusne učinke koji se povezuju s ne-glikoziliranim spojevima, a posebice -OH skupinom na položaju 3 na prstenu. Iako je broj *in vivo* studija malen, učinkovitost apigenina primjećena je na animalnim modelima dijabetesa, raka, Alzheimerove bolesti, amnezije te depresije. Proveden je i manji broj kliničkih studija u kojima su ispitanici unosili apigenin oralno ili topikalno. Uviđena su poboljšanja kognitivnih sposobnosti u pacijenata s Alzheimerovom bolešću koji su uzimali apigenin 2 puta dnevno tijekom 24 mjeseca. Smanjena je potreba za analgeticima u pacijenata s osteoartritisom koljena nakon topikalne primjene ulja kamilice 3 puta dnevno kroz tri tjedna. Upotreba 500 mg ekstrakta kamilice 3 puta dnevno dovela je do manje izraženosti simptoma anksioznog poremećaja i dr (Salehi i sur., 2019).

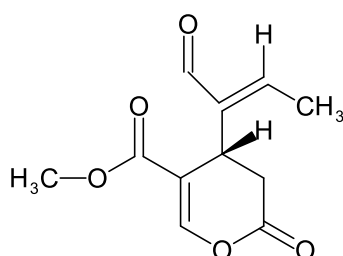
Luteolin je, kao i apigenin, vrlo čest spoj koji nalazimo u voću, povrću i ljekovitom bilju. U tradicionalnoj kineskoj medicini biljke bogate njime koriste se u liječenju hipertenzije, upalnih poremećaja i raka. Flavonoidi su poznati kao fitoestrogeni jer vezanjem na ER aktiviraju signalne puteve (Lin i sur., 2008). Sam luteolin već pri malim koncentracijama pokazuje jak estrogenski učinak, dok istovremeno ima anti-progesteronsko djelovanje (Nordeen i sur., 2013). Zanimljivo je i da rutin utječe na ER α i ER β i uz njih povezane estrogene aktivnosti nakon metabolizma crijevnom mikroflorom (Guo i sur., 2018). Ligandi sa sintetskim anti-

progestinskim djelovanjem su često toksični i reagiraju s drugim steroidnim receptorima. S druge strane, nedavne studije upućuju da luteolin inhibira razne vrste karcinoma, *in vitro* i *in vivo*, s vrlo malom toksičnošću. Cook i suradnici su u svojim studijama pokazali da luteolin ima potencijal ometanja angiogeneze te sprječavanja rasta karcinoma dojke ovisnih o progestinu. Luteolin blokira i rast fenotipa nalik matičnim stanicama humanog karcinoma dojke. Zbog višestrukog antikarcinogenog djelovanja potencijalan je terapeutik u liječenju agresivnih ili teško lječivih vrsta raka dojke.

1.1.2.2. Oleokoronal, oleomisional i S-(E)-Elenolid

Interes mnogih studija ispitivanja bioloških aktivnosti proteklog desetljeća su spojevi maslinovih ulja tirozol, hidroksitirozol te sekoiridoidi poput oleokantala i oleaceina. Ipak, u proteklih nekoliko godina nađeni su i novi spojevi, koji se u nekim uljima bogatim polifenolima, mogu naći i u većim količinama.

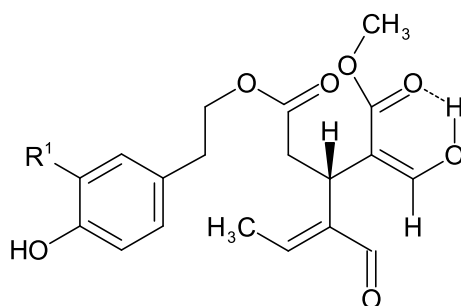
S-(E)-elenolid nije polifenol, međutim može se svrstati u sekoidiroidne derivate. Rigakou i sur. su prvi karakterizirali ovaj spoj koristeći 1D i 2D NMR u kombinaciji s GC-MS-om i dokazali njegovu prisutnost u velikom broju maslinovih ulja. Sadržaj elenolida varirao je od 0 do 2800 mg kg⁻¹. U istom su radu pokazali i da reakcijom elenolida i vode nastaje elenoidna kiselina. Upravo zbog ovog svojstva S-(E)-elenolid mogao bi biti i marker kvalitetnih maslinovih ulja s niskim sadržajem vode. S-(E) elenolid je i potencijalan antihipertenzivni spoj, međutim ovaj je učinak još je nedovoljno istražen.



Slika 6. S-(E)-elenolid.

Diamantakos i suradnici su 2015. godine dvije stabilne enolne forme ligstrozid i olerupein aglikona po prvi put opisali kao izvorne sastavnice maslinovog ulja. Enolni oblik ligstrozid aglikona nazvan je oleokoronal, dok je enolni oblik olerupein aglikona nazvan

oleomisional. U određenim sortama maslinovih ulja nalaze se kao glavne fenolne sastavnice, dok ih u nekim ima u neznatnim količinama ili nisu uopće prisutni. Promatranjem polifenolnih sastavnica tijekom miješanja (malaksacije) maslinove paste uočena je pretvorba oleokoronala i oleomisionala u oleokantal i oleacein (Diamantikos i sur., 2020). Oleokoronal i oleomisional kao sekoiridiodi imaju potencijalan biološki učinak kao i ostali spojevi ove skupine.



Oleokoronal $R_1=H$
 Oleomisional $R_1=OH$

Slika 7. Strukture oleokoronala i oleomisionala.

1.2. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA U MASLINOVIM ULJIMA

Metode koje se uobičajeno koriste za analizu polifenola u djevičanskim maslinovim uljima uglavnom se temelje na spektrofotometrijskim i separacijskim metodama. Jedna od starijih metoda upravo je spektrofotometrijska, Folin-Ciocalteu (F-C) metoda, kojom se određuje ukupni sadržaj polifenola. Primjenjuju se i elektroanalitičke metode poput amperometrije i voltametrije za određivanje *o*-difenola. U novije vrijeme prednost imaju tehnike koje daju informacije o pojedinim polifenolnim spojevima.

1.2.2. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija je eksperimentalna metoda kojom se mjeri količina svjetlosti koju uzorak apsorbira. Koristi se u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. Mjerno područje obuhvaća

200-380 nm za ultraljubičasti te 380-780 nm za vidljivi dio spektra. Uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja dolazi do elektronskih prijelaza. Kromofori su skupine u molekuli odgovorne za apsorpciju elektromagnetskog zračenja. Neki od kromofora su C=O, C=S, -N=N, -N=O i drugi (Bunzel i Schnedel, 2017).

F-C metoda se najčešće koristi za određivanje ukupnog sadržaja polifenola u biljnim ekstraktima. F-C metoda koju su opisali Singleton i Rossi 1965. se i danas koristi kao standardna metoda. To je jednostavna kolorimetrijska metoda koja ne zahtijeva prethodno razdvajanje sastavnica, vrlo je osjetljiva i daje reproducibilne rezultate (Delgado i sur., 2019). Sadržaj ukupnih polifenola se obično iskazuje u ekvivalentima galne kiseline, a može se iskazati i u ekvivalentima katehina i kavene kiseline. Mana ove metode je neselektivnost. Mnogi reducirajući spojevi mogu ometati ispitivanje. Prisutnost šećera, amina, askorbinske kiseline, aromatskih amina, Fe²⁺ iona uz neke druge sastavnice može dati prividno više koncentracije polifenola. (Bunzel i Schnedel, 2017; Garcia i sur., 2013).

Uz F-C metodu koristi se i kolorimetrijska metoda za određivanje sadržaja *o*-difenola u maslinovim uljima. Ona zahtijeva manje vremena u odnosu na F-C metodu, a selektivna je na spojeve koji sadrže kateholnu strukturu poput hidroksitirozola, luteolina i oleaceina. Metoda predviđa prethodno uklanjanje nepolarnih spojeva poput voskova, triglicerida i tokoferola, obično ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) (Miloš i sur., ured., 2017). Spektrofotometrijske metode su prikladne za manje iskusne operatore u rutinskoj kontroli ekstra djevičanskih maslinovih ulja, dok su tehnike visoke rezolucije prikladnije za istraživačke svrhe (Gallina-Toschi, 2005).

1.2.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) često se opisuje kao brza i učinkovita separacijska tehnika. CE se uspješno primjenjuje u analizi fenolnih spojeva uzoraka ulja, meda, vina, čaja, povrća, voća, i dr (Delgado i sur., 2019). U odnosu na često korištene tehnike poput plinske kromatografije (GC) i tekućinske kromatografije (LC) koje zahtijevaju pažljivu pripremu uzoraka, ova tehnika ne zahtijeva znatniju predobradu uzoraka (Damić i Nigović, 2010). Prednosti su jednostavnost, kraće vrijeme analize, visoka rezolucija, niski troškovi, ekološka prihvatljivost i mogućnost analize svih vrsta analita (Godoy-Caballero i sur., 2012).

Tehnika se temelji na razlici u brzini putovanja čestica u otopini elektrolita pod djelovanjem vanjskog električnog polja. Sastavnice putuju različitom brzinom koja ovisi o njihovom naboju i ionskom radijusu. Ovom tehnikom moguće je razdvojiti i neutralne analite

koji putuju kapilaram zbog elektroosmotskog toka, toka čistog pufera u elektrodi, koji nastaje zbog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare (Damić i Nigović, 2010).

Analiza fenolnih spojeva često se provodi uz UV detekciju. Kako bi se povećala selektivnost i osjetljivost uz nju se može koristiti fluorescencija (Godoy-Callabero i sur., 2012). Uz njih CE se može povezati s masenom spektrofotometrijom (Nevado i sur., 2009), a postoji i primjer kombiniranja CE i HPLC uz MS detekciju kako bi se povećao broj fenolnih sastavnica koje se mogu analizirati (Garcia-Villalba i sur., 2009).

1.2.4. Tekućinska kromatografija

Tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) karakteriziraju dobra razlučivost, učinkovitost i brza analiza. Sama metoda se temelji na raspodjeli analita između stacionarne i pokretne faze koja je tekućina. HPLC ima bitnu ulogu u određivanju sadržaja pojedinih fenola kao i njihovog ukupnog sadržaja. Trenutno je najčešća, a ujedno i najpouzdanija tehnika za analizu polifenolnih spojeva, a koristi se kromatografija obrnutih faza.

Može se kombinirati s različitim vrstama detektora. UV detekcija je najčešća zbog svoje jednostavnosti i dostupnosti, međutim nedostaje joj selektivnosti i osjetljivosti (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005). Često se povezuje i s masenim detektorom što je zasad najbolja metoda određivanja polifenola zbog svoje selektivnosti te limita detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ). HPLC-MS se povezuje s tehnikama ionizacije pri atmosferskom tlaku (API), ionizacijom elektroraspršivanjem (ESI) i analizatorom vremena leta (TOF) koje su prikladne za identifikaciju spojeva u sirovim biljnim ekstraktima zbog blage ionizacije (Tasioula-Margari i Tsabolatidou, 2015). Svoje mjesto posljednjeg desetljeća nalazi i UHPLC koja zahtijeva manje količine utrošenog reagensa i kraće trajanje same analize. Kao i HPLC često se kombinira s MS detektorima. Lonzano-Castellon i suradnici su razvili jednostavnu UHPLC-ESI-MS/MS analizu koja traje svega 6,5 minuta kojom se određuje sadržaj glavnih sekoiridioda maslinovih ulja. Iako MS detekcija ima mnogo svojih prednosti, pomoću nje je vrlo teško identificirati nepoznate spojeve.

1.2.5. Plinska kromatografija

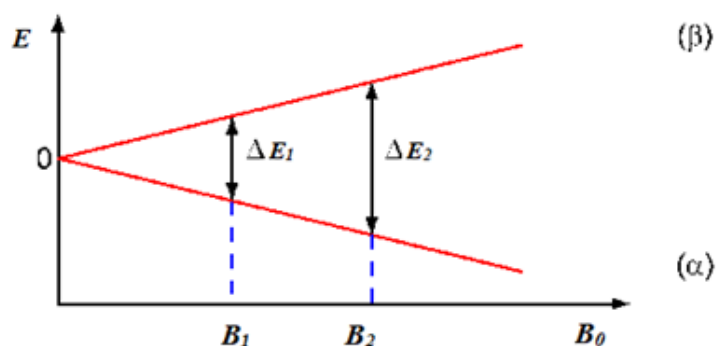
Plinska kromatografija (GC) se često koristi u analizi sastava masnih kiselina triglicerida, tokoferola, sterola i u otkrivanju krivotvorenja maslinovih i drugih biljnih ulja. GC je separacijska tehnika koja se temelji na raspodjeli tvari između mobilne faze u plinovitom stanju te stacionarne faze koja se nalazi u koloni pri čemu se te faze međusobno ne miješaju. Tehnika je primjenjiva na tvari koje su hlapljive na njenim radnim temperaturama (Abdelrahman i sur., 2019).

Zbog visoke učinkovitosti, ova tehnika omogućuje razdvajanje sastavnica složenih smjesa u razumnom vremenu i njihovu točnu kvantifikaciju. Glavni nedostatak ove metode je što većina polifenola nije hlapljiva što zahtijeva derivatizaciju spojeva prije analize. Ipak, vrlo je učinkovita u analizi fenolnih kiselina i flavonoida (Delgado i sur., 2019). Često je povezana s MS. Na taj se način može identificirati više spojeva i nije potrebna upotreba analitičkih standarda. U 2011. su Garcia-Villalba i suradnici u svom radu pokazali primjenu GC-APCI-TOF-MS u identifikaciji i kvantifikaciji 21 fenolnog spoja maslinovog ulja. U drugom je radu ova tehnika zajedno s LC-ESI-TOF-MS korištena za određivanje polifenolnog profila maslinovih ulja. Autori ovog rada su zaključili da GC-MS metoda omogućuje bolje razdvajanje sastavnica te pokazuje određene prednosti oko identifikacije sekoiridoida (Bajoub i sur., 2015).

1.3. ANALIZA MASLINOVIH ULJA PRIMJENOM NMR SPEKTROSKOPIJE

1.3.1. NMR spektroskopija

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je vrlo korisna metoda u identifikaciji nepoznatih spojeva, a već se koristi u analizi polifenola maslinovih ulja. (Tasioula-Margari i Tsabolatidou, 2015). Spektroskopska je metoda koja se temelji na mjerenju rezonantne apsorpcije radiofrekvencijskog zračenja (100-800 MHz) jezgri smještenih u jakom magnetskom polju. NMR spektroskopijom se mogu proučavati jezgre čiji je spinski kvantni broj jezgre (I) različit od 0. I ovisi o broju protona i neutrona. Jezgre koje imaju I različit od 0 imaju magnetski dipolni moment. U magnetskom polju jezgre mogu imati $2I + 1$ orijentaciju magnetskog momenta koje se razlikuju po energiji. Bez primjene vanjskog magnetskog polja, magnetski momenti jezgara su nasumično orijentirani, a njihovi energetske nivoi degenerirani (iste energije). ^1H jezgra ($I = \frac{1}{2}$) u vanjskom magnetskom polju može zauzeti dvije orijentacije. Energija spinskih stanja jezgara orijentiranih u smjeru magnetskog polja je niža (α -spinsko stanje) od energije jezgara čiji je magnetski moment orijentiran suprotno od smjera vanjskog magnetskog polja (β -spinsko stanje).

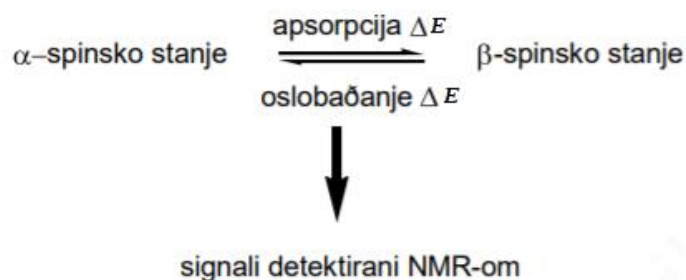


Slika 8. Ovisnost razlike u energiji spinskih stanja o jakosti magnetskog polja B_0 . (www.orgchemboulder.com)

Prijelaz između različitih energetske stanja može se potaknuti dovođenjem elektromagnetskog zračenja (EMZ) odgovarajuće frekvencije. Da bi do prijelaza došlo, energija primijenjenog EMZ mora biti jednaka razlici energija dvaju spinskih stanja. U tom je slučaju frekvencija EMZ jednaka takozvanoj Larmorovoj frekvenciji ν_L koja je opisana jednadžbom:

$$\nu_L = (\gamma_N B_0) / 2\pi$$

gdje je γ_N žiromagnetski omjer jezgre, a B_0 jakost primijenjenog magnetskog polja. Kako bi došlo do apsorpcije (rezonancije) potrebno je mijenjati jakost magnetskog polja ili frekvenciju radiovalnog zračenja. Dok su stariji NMR spektrometri koristili stalnu frekvenciju radiovalnog zračenja, a mijenjali jakost magnetskog polja, novije generacije uređaja mijenjaju frekvenciju. Rezultat je spektar u kojem je prikazana ovisnost intenziteta zračenja o kemijskom pomaku. Kemijski pomak je rezonantna frekvencija jezgre u odnosu na standard u magnetskom polju.



Slika 9. Načelo NMR detekcije. (www.fkit.unizg.hr)

NMR aktivne jezgre imaju neparan maseni broj (A) i/ili broj protona (Z). Kako su ugljik i vodik elementi koji su najčešće prisutni u organskim spojevima, upravo se najčešće snimaju ^1H i ^{13}C spektri. Osim ^1H i ^{13}C NMR spektara mogu se proučavati i ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F i ^{31}P spektri. Izotopi koji imaju paran maseni broj i broj protona nemaju spin, a njihove jezgre nisu NMR aktivne. Primjeri takvih jezgara su ^{12}C i ^{16}O (Atkins i de Paula, 2006).

1.3.2. Analiza maslinovog ulja ^1H NMR spektroskopijom

U posljednja je dva desetljeća značajno porastao broj analiza lipida u uljima NMR spektroskopijom. Osim što pruža mnogo informacija o lipidnom sastavu, daje informacije i o drugim skupinama spojeva prisutnih u djevičanskim maslinovim uljima. Prednost metode je što nije potrebna prethodna modifikacija uzorka. ^1H NMR spektroskopija se općenito često koristi u analizi jestivih ulja te je ujedno i najkorištenija NMR tehnika. Njena prednost nad ^{13}C NMR spektroskopijom je brža i jednostavnija kvantitativna analiza (del Caño-Ochoa i sur., 2019).

^1H NMR spektroskopija je već našla svoje mjesto u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi fenolne frakcije maslinovog ulja. Uspješno su identificirani i kvantificirani lignani, flavonoidi, sekoiridiodi, fenolne kiseline i alkoholi. Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola korišten

je za karakterizaciju sorte ekstra djevičanskog maslinovog ulja, njeno zemljopisno podrijetlo i za senzornu analizu. Osim po sastavu fenola, ulja različitih sorti maslina se razlikuju po kvantitativnom sastavu masnih kiselina. (Olmo-Cunillera i sur., 2020). U 2012, Karkoula i suradnici su razvili metodu za direktno određivanje sadržaja oleokantala i oleaceina. Primjenom ove metode određen je sadržaj ovih biološki vrlo zanimljivih spojeva u većem broju različitih maslinovih ulja (López-Yerena i sur., 2019, Karkoula i sur., 2014). Ovom tehnikom su 2015. godine identificirani spojevi oleokoronal, oleomisional, a 2020. S-(E)-elenolid. Također, Diamatakos i suradnici su u 2020. pomoću ^1H NMR-a odredili sadržaj oleokoronala i oleomisionala.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje posljednjih godina, kao osnovnu sastavnicu mediteranske prehrane, nutricionisti sve više preporučuju upravo zbog primjećениh pozitivnih učinaka na zdravlje. Taj učinak posljedica je povoljnog sastava masnih kiselina (posebice nezasićene, oleinske kiseline) kao i biološki aktivne, udjelom male polifenolne frakcije. Upravo maslinova ulja s visokim sadržajem polifenola, većim od 250 mg/kg, mogu nositi oznaku zdravstvene tvrdnje „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa“. Od pozitivnih učinaka može se istaknuti izrazita antioksidativna aktivnost polifenola i flavonoida, antikarcinogeni i imunomodulatorni učinak, kardioprotektivno djelovanje i antimikrobni učinak. S razvojem novih analitičkih tehnika, ali i njihovim povezivanjem otkrivaju se dosad nepoznati fenolni spojevi. Tako su posljednjih nekoliko godina identificirani oleokoronol, oleomisional te S-(E)-elenolid. Zbog svega navedenog, od posebne je važnosti moći prepoznati maslinova ulja koja su posebno bogata polifenolnim spojevima koji su specifični za maslinovo ulje, te se ističu kao biološki aktivne tvari. ^1H NMR tehnika je prikladna za analizu složenih smjesa kao što je maslinovo ulje i određivanje sadržaja polifenolnih sastavnica.

Cilj ovog diplomskog rada je spektrofotometrijskim metodama odrediti ukupni sadržaj polifenola, flavonoida i *o*-difenola, te ^1H NMR spektroskopijom odrediti sadržaj polifenola oleokoronala, oleomisionala te S-(E)-elenolida, odabranih uzoraka hrvatskih maslinovih ulja. Polifenolni ekstrakti okarakterizirani u okviru ovog diplomskog rada koristit će se za biološka ispitivanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, *p.a.* (Merck)
- Aluminijev klorid, *p.a.* (Merck)
- Cikloheksan, *p.a.* (Carlo Erba)
- Folin-Ciocalteu reagens (Fluka, BioChemika)
- Metanol, za HPLC (Merck)
- N-heksan, *p.a.*
- 1 mol dm⁻³ titrival natrijev hidroksid (GRAM MOL)
- Natrijev karbonat, *p.a.* (Merck)
- Natrijev molibdat, *p.a.* (Aldrich)
- Natrijev nitrit, *p.a.* (Merck-Alkaloid)
- Redestilirana voda
- Siringaldehid, *p.a.* (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Uzorci maslinovog ulja

Ispitivani su uzorci 4 maslinova ulja, dobivena od lokalnih proizvođača, sorti Rosulja (Istra), Vodnjanska Crnica (Istra) te dva višesortna ulja (Istra i Zadar). Svi uzorci maslinovih ulja čuvani su u tamnim bocama pri temperaturi od 4 °C.

3.2. METODE

3.2.1. Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja metodom tekuće-tekuće

3.2.1.1. Ekstrakcija s metanolom

U okruglu tikvicu prekrivenu, aluminijskom folijom, odvaži se 20 g maslinovog ulja. U tikvicu s uljem doda se 10 mL n-heksana i 15 mL metanola. Tikvica s uljem i otapalima uroni se u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Voda je u ultrazvučnoj kupelji sobne temperature, a maksimalno do 30 °C. Sadržaj tikvice se potom prenosi u epruvete za centrifugiranje te centrifugira 7 minuta na 4000 rpm. Gornji metanolni sloj se odvoji u drugu tikvicu te se čuva u hladnjaku. Donji, heksanski sloj prebaci se u tikvicu u kojoj je prethodno izvagano ulje i doda

15 mL metanola te se ponavlja postupak s ultrazvučnom kupelji, centrifugiranjem i odvajanjem slojeva još 2 puta. Metanolni slojevi prikupljeni nakon ukupno 3 centrifugiranja u lijevku za odjeljivanje izmućkuju se 2 puta s po 90 mL n-heksana. Donji, metanolni slojevi, se objedine u suhoj, prethodno odvaganoj tikvici. Sadržaj u tikvici se ispari pomoću vakumskog isparivača, a potom se tikvica sa suhim ostatkom pohrani u hladnjak na 4 °C.

3.2.1.2. Ekstrakcija s acetonitrilom

U okruglu tikvicu obloženu aluminijskom folijom se izvaže 5 g maslinovog ulja te doda 20 mL cikloheksana i 25 mL acetonitrila i miješa na električnoj miješalici tijekom 2 minute nakon čega se sadržaj prebaci u epruvete za centrifugiranje. Centrifugira se 5 minuta na 4000 rpm. Odvoji se gornji acetonitrilni sloj i ispari na vakumskom isparivaču do suha. Uzorak se do korištenja čuva u hladnjaku na 4 °C.

Kod ekstrakcije većih masa ulja korišteni su proporcionalno veći volumeni otapala. U slučaju ekstrakcije 10 g ulja dodaje se 50 mL acetonitrila te 40 mL cikloheksana. Za 20 g ulja dodaje se 80 mL cikloheksana te 100 mL acetonitrila, te za ekstrakciju 25 g ulja koristi se 100 mL cikloheksana te 125 mL acetonitrila.

3.2.2. Priprema otopina reagensa za UV-Vis analizu polifenola u maslinovom ulju

10 % otopina AlCl_3 : pripremi se vaganjem 2,50 g aluminijevog klorida u odmjerne tikvici od 25 mL te nadopuni redestiliranom vodom do oznake. Voda se dodaje postupno uz miješanje dok se tikvica hladi pod mlazom vode.

Metanol : voda = 1:1 v/v pripremi se miješanjem jednakih volumena MeOH i vode.

1 mol dm^{-3} otopina NaOH: pripremi se dodavanjem volumetrijskog standarda natrijevog hidroksida u odmjernu tikvicu od 1000 mL. Pakiranje se preko plastičnog lijevka stavlja na grlo tikvice te probuši staklenim štapićem. Vodom temperature 20°C se kvantitativno ispere ambalaža te stakleni štapić, a odmjerne tikvica nadopuni do oznake.

20 % otopina Na_2CO_3 : pripremi se vaganjem 10,00 g natrijevog karbonata u odmjernoj tikvici od 50 mL. Natrijev karbonat se prvo otopi zagrijanom redestiliranom vodom temperature ~ 60 °C, a nakon hlađenja se tikvica nadopuni redestiliranom vodom do oznake.

5% otopina Na_2MoO_4 : pripremi se vaganjem 1,25 g natrijevog molibdata u odmjernoj tikvici od 25 mL te se do oznake nadopuni 50 % metanolom. Otapalo se dodaje postupno uz snažno i dugotrajno miješanje zbog slabe topljivosti spoja.

3.2.3. Priprema uzoraka za UV-Vis analizu

Suhi ekstrakti polifenola, pripremljeni prema postupku opisanom pod 3.2.1. se prije analize otope u odgovarajućoj količini metanola ovisno o masi ulja iz koje su ekstrahirani - metanolni ekstrakt. Suhi ekstrakt pripremljen postupkom opisanim pod 3.2.1.1. iz 20 g ulja sorte Rosulja, otopljen je u 1,7 mL metanola. Suhi ekstrakt pripremljen postupkom opisanim pod 3.2.1.2. iz 10 g ulja sorte Rosulja otopljen je u 0,85 mL metanola. Suhi ekstrakti pripremljeni postupkom opisanim pod 3.2.1.2. iz 20 g ulja sorte Vodnjanska Crnica, 25 g višesortnog istarskog ulja, 20 g višesortnog zadarskog ulja (2 ekstrakta) te 20 g ulja sorte Rosulja otopljeni su u 0,7 mL metanola. Tako priređeni metanolni ekstrakti se filtriraju kroz filter pora veličine 0,2 μm .

0,5 mL priređenih metanolnih ekstrakta iz 25 g višesortnog istarskog ulja, 2 ekstrakta iz 20 g višesortnog zadarskog ulja te 20 g ulja sorte Rosulja razrijeđeni su s 500 μL metanola (razrijeđena otopina metanolnog ekstrakta). Razrijeđene otopine korištene su za UV-VIS analizu.

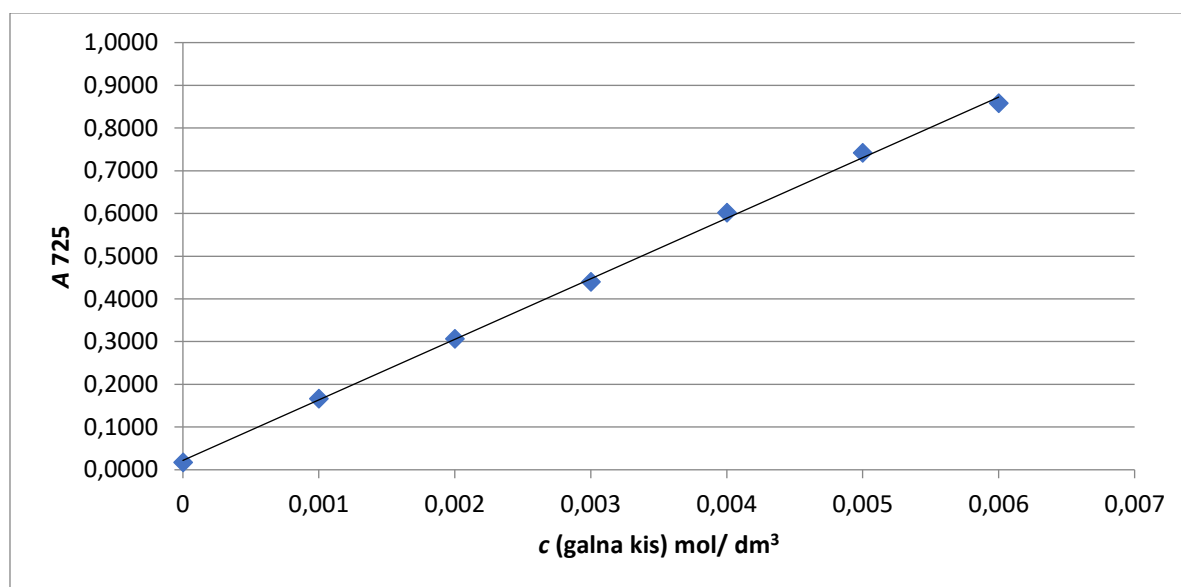
3.2.4. UV-Vis spektrofotometrijske analize polifenola u maslinovom ulju

3.2.4.1. Određivanje ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određuje se Folin-Ciocalteu kolorimetrijskom metodom uz manje izmjene (Singleton i sur., 1999, Garcia i sur., 2013). U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 0,1 mL prethodno pripremljenog metanolnog ekstrakta te 5 mL redestilirane vode. U istu se tikvicu odpipetira 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa nakon čega se sadržaj u tikvici miješa 3 minute. Po isteku 3 minute odpipetira se 1,5 mL 20 % otopine natrijevog karbonata i nadopuni redestiliranom vodom do oznake, zatvori čepom i snažno promućka. Tako pripremljena otopina čuva se na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon sat

vremena, mjeri se apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 725 nm. Sva mjerenja su izvedena u duplikatu. U slučaju vrijednosti apsorbancija izvan mjernog, odnosno linearnog područja uzima se manji alikvot metanolnog ekstrakta, a ostatak do 0,1 mL čini metanol.

Iz jednadžbe baždarnog pravca se na temelju izmjerene apsorbancije odredi koncentracija ukupnih polifenola u ispitivanom metanolnom ekstraktu. Koncentracija ukupnih polifenola u maslinovom ulju se preračuna iz dobivene vrijednosti koncentracije polifenola u metanolnom ekstraktu uzimajući u obzir masu ulja iz kojeg su ekstrahirani polifenoli te volumen metanola u kojem je otopljen suhi ekstrakt.



Slika 10. Baždarni pravac za određivanje sadržaja ukupnih polifenola u maslinovom ulju (rezultati iz laboratorija).

Vrijednosti limita detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) računaju se slijedećim formulama:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot (S_b/a) \qquad \text{LOQ} = 10 \cdot (S_b/a)$$

Gdje je S_b standardna devijacija odsječka pravca i a nagib baždarnog pravca. Za ovu metodu LOD iznosi 0,034 mg/mL, a LOQ 0,085 mg/mL ekvivalenta galne kiseline, što odgovara koncentraciji 1,19 mg/kg odnosno 2,98 mg/kg ulja ukoliko se po standardnom postupku ekstrahira 20 g ulja te suhi ekstrakt otopi u 0,7 mL metanola.

3.2.4.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određuje se prema uobičajenom postupku koji je opisan u literaturi (Kim i sur., 2003) na sljedeći način:

A) U odmjernu tikvicu od 10 mL doda se 4 mL redestilirane vode te odgovarajući alikvot metanolnog ekstrakta razrijeđen do 1 mL s vodom (razrijeđena otopina metanolnog ekstrakta). U trenutku dodavanja 0,3 mL 5 % otopine NaNO_2 uključi se štoperica ($t=0$ min). Po isteku 5. minute ($t=5$ min) doda se 0,3 mL 10 % otopine AlCl_3 te se nakon jedne minute ($t=6$ min) doda 2 mL 1 mol dm^{-3} otopine natrijevog hidroksida, a tikvica se nadopuni redestiliranom vodom do oznake i dobro pomiješa ($t=0$ min). Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 510 i 700 nm 30 sekundi ($t=0,5$ min) te dvije minute nakon što je promiješan sadržaj ($t=2$ min).

B) Isti postupak se provodi s 1 mL redestilirane vode umjesto razrijeđene otopine metanolnog ekstrakta. Mjerenja su izvedena u duplikatu.

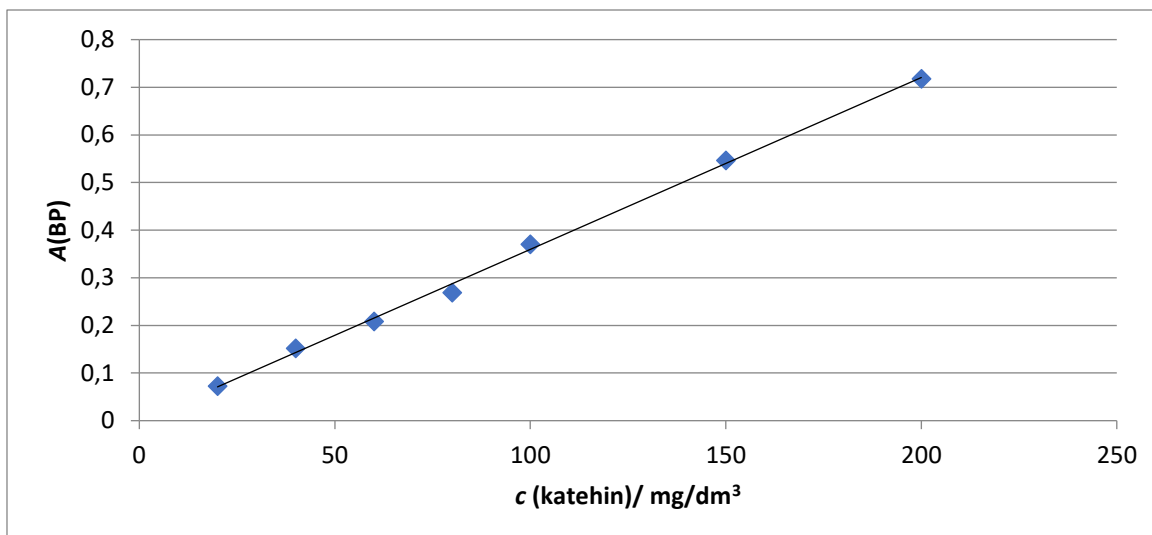
Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanom metanolnom ekstraktu odredi se uz pomoć baždarnog pravca na temelju apsorbancije $A(\text{BP})$ dobivene sljedećim računom:

$$A(\text{A}) = A(\text{A})_{510} - A(\text{A})_{700}$$

$$A(\text{B}) = A(\text{B})_{510} - A(\text{B})_{700}$$

$$A(\text{BP}) = A(\text{A}) - A(\text{B})$$

U računu se koriste apsorbancije izmjerene 30 sekundi nakon mućkanja otopine ($t=0,5$ min). Apsorbancija se mjeri i nakon 2 minute ($t=2$ min) kako bi se utvrdilo da je reakcija završena. Sadržaj ukupnih flavonoida u maslinovom ulju preračuna se iz dobivene vrijednosti koncentracije metanolnog ekstrakta uzimajući u obzir masu ulja iz koje su ekstrahirani polifenoli te volumen metanola u kojem je otopljen suhi ekstrakt.



Slika 11. Baždarni pravac za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u maslinovom ulju (rezultati iz laboratorija).

Za ovu metodu LOD iznosi 0,0072 mg/mL katehina, a LOQ iznosi 0,0219 mg/mL ekvivalenta katehina, što odgovara koncentraciji 0,252 mg/kg, odnosno 0,767 mg/kg ulja ukoliko se po standardnom postupku ekstrahira 20 g ulja te suhi ekstrakt otopi u 0,7 mL metanola.

3.2.4.3. Određivanje *o*-difenola

U odmjerne tikvici od 5 mL pripremi se ispitivana otopina metanolnog ekstrakta miješanjem 5 mL otapala metanol:voda = 1:1 (v/v) te odgovarajućeg alikvota metanolnog ekstrakta razrijeđenog metanolom do 0,5 mL.

A) U kivetu se doda 2 mL prethodno pripremljene ispitivane otopine te 0,5 mL 5 % otopine Na₂MoO₄. Sadržaj se pomiješa te ostavi stajati u mraku pri sobnoj temperaturi 15 minuta nakon čega se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 370 nm, A(U).

B) U kivetu se doda 2 mL ispitivane otopine te 0,5 mL 50 % otopine metanola. Sadržaj se pomiješa i ostavi stajati u mraku 15 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 370 nm, A(B). Postupak se izvodi u duplikatu.

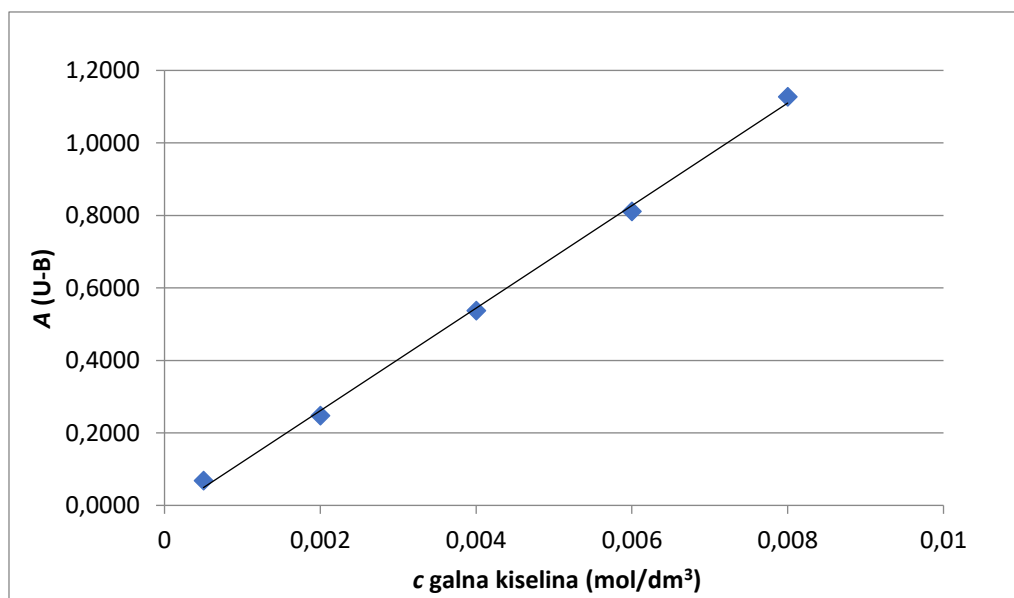
Sadržaj *o*-difenola u metanolnom ekstraktu se određuje na temelju apsorbancije A(U-B) uz pomoć baždarnog pravca koji je pripremljen sa standardom galnom kiselinom. Sadržaj *o*-difenola u maslinovom ulju se preračuna iz dobivene vrijednosti koncentracije metanolnog

ekstrakta uzimajući u obzir masu ulja iz koje su ekstrahirani polifenoli te volumen metanola u kojem je otopljen suhi ekstrakt.

$A(U-B)$ dobije se slijedećim računom:

$$A(U-B) = A(U) - A(B)$$

i predstavlja razliku apsorbancija dobivenih pod mjerenjima A) i B)



Slika 12. Baždarni pravac za određivanje *o*-difenola u uzorcima maslinovog ulja (rezultati iz laboratorija).

LOD ove metode je 0,0680 mg/mL ($A(U-B)=0,0346$) i LOQ 0,1871 mg/mL ($A(U-B)= 0,1336$) ekvivalenta galne kiseline, što odgovara koncentraciji 2,38 mg/kg, odnosno 6,55 mg/kg ulja ukoliko se po standardnom postupku ekstrahira 20 g ulja te suhi ekstrakt otopi u 0,7 mL metanola.

3.2.3. ¹H NMR spektrofotometrijska analiza polifenolnog ekstrakta maslinovog ulja

Pripremljena su po dva ekstrakta iz 5,00 g svakog od 4 maslinova ulja (Rosulja, Vodnjanska crnica, višesortno Istra i Zadar) prema postupku opisanom pod 3.2.1.2. pri čemu se prije isparavanja uzorka u tikvicu doda 1 mL acetonitrilne otopine siringaldehida koncentracije 0,5 mg/mL.

Suhi ostatak dobiven ekstrakcijom otopljen je u 750 μ L deuteriranog kloroforma, $CDCl_3$, a 550 μ L je prenešeno u 5 mm NMR tubu. ¹H NMR spektri snimani su na instrumentu Bruker Advance 600 (14,1 T) na Institutu Ruđer Bošković, Centru za NMR, pri temperaturi od 25 °C.

Spektri su snimani na frekvenciji od 600,130 MHz te je za snimanje spektara korištena spektralna širina 0-20 ppm. Vrijeme akvizicije iznosilo je 1,36 s. Relaksacijsko vrijeme odgode bilo je 5,0 s uz 64 pulsa po spektru i pulsni kut 90°.

Dobiveni ¹H NMR spektri korišteni su za kvantitativno određivanje oleokoronala, oleomisionala prema postupku Diamantikos i suradnika, 2020., te S-(E)-Elenolida prema postupku Rikagau i suradnika, 2019. Spektri su obrađeni uz primjenu *TopSpin* programa (*TopSpin* 4.0.7., Bruker), uz ručno integriranje odgovarajućih signala.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE

U okviru ovog diplomskog rada analitički su obrađeni uzorci maslinovih ulja. Određena je ponovljivost metode ekstrakcije s acetonitrilom, uspoređene su dvije metode ekstrakcije, metanolom odnosno acetonitrilom i ispitana je stabilnost metanolne otopine dobivene otapanjem suhog polifenolnog ekstrakta kod čuvanja na temperaturi -20°C . Sadržaj ukupnih fenola određen je spektrofotometrijski uz F-C reagens, sadržaj flavonoida uz NaNO_2 i AlCl_3 te *o*-difenola uz Na_2MoO_4 reagens.

4.1.1. Sadržaj ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima maslinovih ulja određen je na temelju vrijednosti izmjerenih apsorbancija metanolnog ekstrakta ulja korištenjem ranije pripremljenog baždarnog pravca standarda galne kiseline jednadžbe $y=141,73x + 0,0219$ prikazanog na slici 10 pri čemu je x koncentracija uzorka, a y izmjerena apsorbancija uzorka. Metoda je linearna u rasponu koncentracija $0,0851 - 1,0207$ mg/mL ekvivalenta galne kiseline, što odgovara koncentraciji $2,98$ mg/kg, odnosno $35,72$ mg/kg ulja ukoliko se po standardnom postupku ekstrahira 20 g ulja te suhi ekstrakt otopi u $0,7$ mL metanola. Spektrofotometrijska metoda s F- C reagensom temelji se na prijenosu elektrona s fenolnih spojeva na kompleks fosfomolibdatne/fosfovolframatne kiseline u bazičnom mediju. Navedeni spojevi s fenolima stvaraju kromogene spojeve čiji se intezitet obojenja mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 725 nm.

Tablica 1. Prikaz mase ulja korištene za ekstrakciju, otapala za ekstrakciju te volumen otopine metanolnog ekstrakta.

Uzorak	<i>m</i> (maslinovo ulje) /g	Otapalo za ekstrakciju	<i>V</i> (metanol) /mL
Rosulja	20	metanol	1,7
Rosulja	10	acetonitril	0,85
Rosulja (stabilnost otopine ekstrakta)	20	acetonitril	0,7
Vodnjanska Crnica	20	acetonitril	0,7
Višesortno Istra	25	acetonitril	0,7
Višesortno Zadar Ekstrakt 1	20	acetonitril	0,7
Višesortno Zadar Ekstrakt 2	20	acetonitril	0,7

Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola u ispitivanim maslinovim uljima.

Uzorak	A	c (ukupni fenoli) metanolni ekstrakt (mg/ml)	c (ukupni fenoli) maslinovo ulje (mg/kg)	Srednja vrijednost (mg/kg)	SD	RSD (%)
Rosulja (MeOH)	0,5371	6,183	530	521	6	1,17
	0,5286	6,082	517			
Rosulja (ACN)	0,4855	5,565	473	579	150	25,9
	0,6930	8,055	685			
Rosulja (ACN) stabilnost otopine ekstrakta (mjesec dana nakon pripreme)	0,7612	17,747	621	628	10	1,63
	0,7784	18,161	636			
Vodnjanska Crnica (ACN)	0,3674	8,294	290	319	41	12,9
	0,4365	9,953	348			
Zadar- višesortno- ekstrakt 1 (ACN)	0,2234	4,837	169	169	0	0,26
	0,2226	4,819	169			
Zadar- višesortno- ekstrakt 2 (ACN)	0,4485	5,121	179	178	2	0,86
	0,4434	5,059	177			
Istra- višesortno (ACN)	0,5812	13,426	376	355	29	8,24
	0,5196	11,947	335			

Na temelju koncentracije ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu moguće je odrediti sadržaj ukupnih polifenola u maslinovom ulju korištenjem slijedeće jednadžbe:

$$c \text{ (ukupni polifenoli, ulje/ mg/kg)} = \frac{c \text{ (metanolni ekstrakt/ mg/mL)} \cdot V \text{ (ekstrakt/mL)}}{m \text{ (maslinovog ulja/kg)}}$$

Napravljena su i analizirana dva ekstrakta zadarskog višesortnog ulja kako bi se ispitala ponovljivost metode ekstrakcije s acetonitrilom. Suhi ekstrakt polifenola dobiven je iz 20 g ulja, a otopljen je u 0,7 mL metanola. Spektrofotometrijskom metodom s F-C reagensom je određen sadržaj polifenola u oba ekstrakta. Sadržaj polifenola prvog ekstrakta iznosio je 169 ± 0 mg/kg te je sadržaj polifenola drugog ekstrakta iznosio 178 ± 2 mg/kg ulja što odgovara RSD od 3,7 %. Podudaranje rezultata dobivenih mjerenjem sadržaja ukupnih polifenola dva ekstrakta istog uzorka upućuje na ponovljivost metode ekstrakcije acetonitrilom.

Uspoređen je sadržaj polifenola koji se dobije analizom metanolnog ekstrakta (priprema opisana u poglavlju **3.2.1.1.**) i acetonitrilnog ekstrakta ulja (priprema opisana u poglavlju **3.1.1.2.**) Uzorak ulja koji je korišten u tu svrhu je Rosulja. Metanolni ekstrakt dobiven je iz maslinovog ulja, ekstrakcijom s metanolom i n-heksanom, a acetonitrilni ekstrakt je dobiven iz ulja, ekstrakcijom s acetonitrilom i cikloheksanom. U postupku ekstrakcije metanolom smjesa je bila smještena u ultrazvučnu kupelj, dok je u postupku ekstrakcije acetonitrilom sadržaj miješan na električnom mješaču. Za razliku od postupka ekstrakcije metanolom, u postupku ekstrakcije acetonitrilom nedostaje korak uklanjanja masnoća n-heksanom. Postupci ekstrakcije opisani su u literaturi pri čemu se metanolni ekstrakti koriste za HPLC analize, dok se acetonitrilni ekstrakti koriste za NMR analize. Metode ekstrakcije su uspoređene kako bi se uvidjelo može li vremenski kraći postupak ekstrakcije acetonitrilom, zamijeniti postupak ekstrakcije metanolom. Spektrofotometrijskom metodom s F-C reagensom je određen sadržaj polifenola u oba ekstrakta. Sadržaj polifenola u metanolnom ekstraktu iznosi 521 ± 6 mg/kg, dok sadržaj polifenola u acetonitrilnom ekstraktu iznosi 579 ± 150 mg/kg. Sadržaj polifenola acetonitrilnog ekstrakta je nešto viši, ali uz veće odstupanje.

Metanolna otopina ekstrakta koji je pripremljen ekstrakcijom s acetonitrilom ulja sorte Rosulja čuvana je mjesec dana u hladnjaku na temperaturi od -20°C . U ovom je uzorku utvrđena koncentracija polifenola 628 ± 10 mg/kg, dok je koncentracija polifenola acetonitrilnog ekstrakta, čiji je sadržaj izmjeren neposredno nakon pripreme, iznosila 579 ± 150 mg/kg. Nema značajne razlike u sadržaju, no trebalo bi ponoviti mjerenje koje ima veliku SD kako bi se utvrdilo je li ono slučajno.

Sadržaj ukupnih polifenola u ispitanim uzorcima maslinovih ulja varira u rasponu od 168-628 mg ekvivalenta galne kiseline po kg uzorka maslinovog ulja (Tablica 1). Najviša vrijednost utvrđena je kod sorte Rosulja (Istra), zatim po vrijednosti polifenola slijedi istarsko višesortno ulje (355 ± 29), Vodnjanska Crnica (319 ± 41), dok je najsiromašnije polifenolima zadarsko višesortno ulje (169 ± 0). Bayram i suradnici su analizirali 55 uzoraka ulja porijeklom iz Italije, Španjolske, Turske, Grčke, Francuske, Portugala, Australije, SAD-a i Južne Afrike.

Raspon vrijednosti sadržaja ukupnih fenola varirao je od 40-530 mg/kg ekvivalenata galne kiseline. Rezultati dobiveni u ovom radu su u skladu s vrijednostima polifenola u prethodno navedenom radu.

4.1.2. Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom na temelju izmjerenih apsorbancija metanolnih ekstrakata ispitivanih uzoraka maslinovog ulja na 510 nm nakon 30 sekundi mjerenja uz pomoć baždarnog pravca standarda katehina jednadžbe $y = 0,003608x - 0,001203$, gdje je x koncentracija uzorka, a y izmjerena apsorbancija uzorka. Metoda je linearna u rasponu koncentracija 0,020 – 0,200 mg/mL ekvivalenta katehina što odgovara koncentraciji od 0,7 mg/kg, odnosno 7 mg/kg ulja ukoliko se po standardnom postupku ekstrahira 20 g ulja te suhi ekstrakt otopi u 0,7 mL metanola. U osnovi, metoda se temelji na nitrozilaciji flavonoida koji s aluminijskim ionima u lužnatom mediju stvaraju crvene kelate čija se apsorbancija mjeri na 510 nm.

Tablica 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim maslinovim uljima.

Uzorak	A(BP)	c (ukupni flavonoidi) metanolni ekstrakt (mg/dm ³)	c(ukupni flavonoidi) maslinovo ulje (mg/kg)	Srednja vrijednost (mg/kg)	SD	RSD (%)
Rosulja (MeOH)	0,5668	3149	268	318	71	22,4
	0,7811	4336	369			
Rosulja (ACN)	0,2232	4146	352	321	44	13,7
	0,1836	3415	290			
Rosulja (ACN) Stabilnost otopine ekstrakta (mjesec dana star uzorak)	0,5887	5450	381	380	2	0,39
	0,5854	5419	379			
Vodnjanska Crnica (ACN)	0,2413	2241	157	160	4	2,41
	0,2497	2318	162			
Zadar- višesortno (ACN) ekstrakt 1	0,1467	1366	96	103	10	9,59
	0,1682	1565	110			
Zadar- višesortno (ACN) ekstrakt 2	0,2795	1556	109	105	5	5,02
	0,2602	1449	101			
Istra- višesortno (ACN)	0,3213	2980	167	181	21	11,4
	0,3777	3500	196			

Na temelju koncentracije ukupnih flavonoida u metanolnom ekstraktu moguće je odrediti sadržaj ukupnih flavonoida u maslinovom ulju korištenjem slijedeće jednadžbe:

$$c \text{ (ukupni flavonoidi, ulje/ mg/kg)} = \frac{c \text{ (metanolni ekstrakt/ mg/mL)} \cdot V \text{ (ekstrakt/mL)}}{m \text{ (maslinovog ulja/kg)}}$$

Određen je sadržaj ukupnih flavonoida dva ekstrakta višesortnog zadarskog ulja pripravljena ekstrakcijom acetonitrilom kako bi se ispitala ponovljivost metode. Sadržaj ukupnih flavonoida u prvom ekstraktu iznosio je 103 ± 10 mg/kg ulja, a sadržaj flavonoida u drugom ekstraktu iznosi 105 ± 5 mg/kg ulja, što odgovara RSD vrijednosti od 1,4 %. Slaganje u sadržaju ukupnih flavonoida upućuje na ponovljivost metode ekstrakcije s acetonitrilom.

Uspoređen je sadržaj flavonoida za dva različita postupka ekstrakcije, metanolom i acetonitrilom, uzorka ulja sorte Rosulja (Istra). S oba postupka dobivena je ista koncentracija flavonoida. Sadržaj flavonoida u acetonitrilnom ekstraktu iznosi 321 mg/kg, dok je sadržaj flavonoida u metanolnom ekstraktu 318 mg/kg.

Metanolna otopina ekstrakta koji je pripremljen ekstrakcijom s acetonitrilom ulja sorte Rosulja čuvana je mjesec dana u hladnjaku na temperaturi od -20°C . Utvrđen je nešto veći sadržaj flavonoida (380 ± 2 mg/kg) u odnosu na metanolni ekstrakt pripremljen ekstrakcijom s acetonitrilom čiji je sadržaj izmjeren neposredno nakon pripreme (321 ± 44 mg/kg).

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim uzorcima maslinovih ulja varira u rasponu od 102-380 mg/kg ekvivalenta katehina po kg maslinovog ulja (Tablica 2). Najviši sadržaj flavonoida utvrđen je u ispitivanom uzorku sorte Rosulja (Istra). Po sadržaju zatim slijedi višesortno istarsko ulje (181 ± 21 mg/kg) te Vodnjanska crnica (Istra) (160 ± 4 mg/kg). Najniži sadržaj je utvrđen u višesortnom zadarskom ulju (103 ± 10 mg/kg).

4.1.3. Sadržaj *o*-difenola

Sadržaj *o*-difenola određen je spektrofotometrijskom metodom uz pomoć baždarnog pravca jednadžbe $y=141,43x - 0,022$ koji je pripremljen korištenjem galne kiseline kao standarda, na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3.3., gdje je x koncentracija uzorka, a y izmjerena apsorbancija uzorka. Metoda je linearna u rasponu koncentracija 0,1871-1,3610 mg/mL ekvivalenta galne kiseline što odgovara koncentraciji 6,55 mg/kg, odnosno 47,64 mg/kg ukoliko se prema standardnom postupku ekstrahira 20 g ulja te se suhi ekstrakt otopi u 0,7 mL metanola. Reakcija se temelji na redukciji molibdata (VI) u (V) u prisutnosti *o*-difenola. Apsorbancija reduciranih molibdatnih vrsta se mjeri na 370 nm nakon 15 minuta čuvanja u mraku Sadržaj *o*-difenola dan je u Tablici 3.

Tablica 4. Sadržaj *o*-difenola u ispitivanim uzorcima ulja.

Uzorak	A(U)	A(B)	A(U-B)	\bar{c} (mg/kg)	SD	RSD (%)
Rosulja (MeOH)	0,9426	0,4501	0,4924	184	13	7
	0,7147	0,3584	0,3560			
Rosulja (ACN)	0,5146	0,4453	0,0694	<LOQ		
	0,4679	0,4132	0,0548			
Rosulja (ACN) Ispitivanje stabilnosti otopine ekstrakta (mjesec dana nakon pripreme)	0,9052	0,5508	0,3544	596	95	16
	0,7925	0,3420	0,4505			
Vodnjanska Crnica (ACN)	0,1933	0,1146	0,0787	<LOQ		
	0,1893	0,1164	0,0729			
Zadar- višesortno (ACN)	0,4994	0,6653	-0,1659	<LOQ		
	0,5063	0,6562	-0,1499			
Zadar- višesortno (ACN) Drugi ekstrakt	2,11	2,18	-0,07	<LOQ		
	2,20	2,22	-0,02			
Istra- višesortno (ACN)	0,9612	0,9046	0,0565	<LOQ		
	0,9787	0,9279	0,0508			

Na temelju izmjerene apsorbancije $A(U-B)$, uzimajući u obzir volumen alikvota korišten za analizu, dobije se koncentracija metanolnog ekstrakta (mol/dm^3). Sadržaj *o*-difenola u maslinovom ulju može se izračunati na temelju koncentracije *o*-difenola u metanolnom ekstraktu koristeći slijedeću jednadžbu:

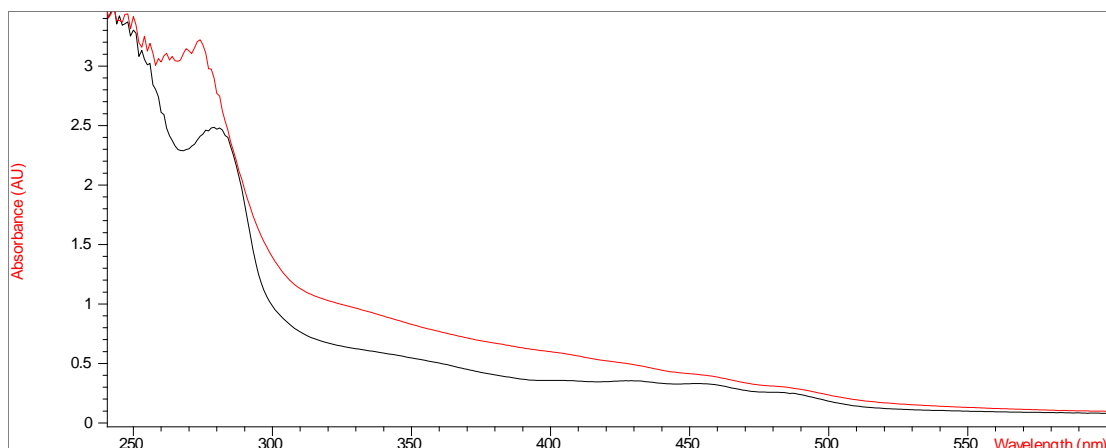
$$c(o - \text{difenoli, ulje/mg/kg}) = \frac{c(\text{metanolni ekstrakt/mol/dm}^3) \cdot V(\text{ekstrakt/mL}) \cdot M(\text{gal. kis.})}{m(\text{maslinovog ulja/kg})}$$

Pripremljena su i analizirana dva ekstrakta zadarskog višesortnog ulja kako bi se ispitala ponovljivost metode ekstrakcije s acetonitrilom. Apsorbancije uzoraka zadarskog višesortnog ulja nisu bile u skladu s očekivanim jer je vrijednost apsorbancije otopine uzorka s otapalom bila veća od apsorbancije otopine uzorka s natrijevim molibdatom, odnosno vrijednost $A(U-B)$ je bila negativna. Pripremljen je drugi ekstrakt zadarskog višesortnog ulja kako bi se utvrdilo je li ovakav rezultat moguća posljedica pogreške prilikom procesa ekstrakcije. Pogreška je mogla biti prilikom odvajanja acetonitrilne frakcije, gdje je pritom mogao biti uhvaćen dio cikloheksanske frakcije koja ne bi isparila prilikom isparavanja ekstrakta. Premalen alikvot uzorka također je moguć razlog nemogućnosti određivanja sadržaja. Unatoč korištenju većeg alikvota metanolne otopine drugog ekstrakta zadarskog višesortnog ulja, razlika apsorbancija $A(U-B)$ je ponovno bila negativna, a sadržaj nije mogao biti kvantificiran.

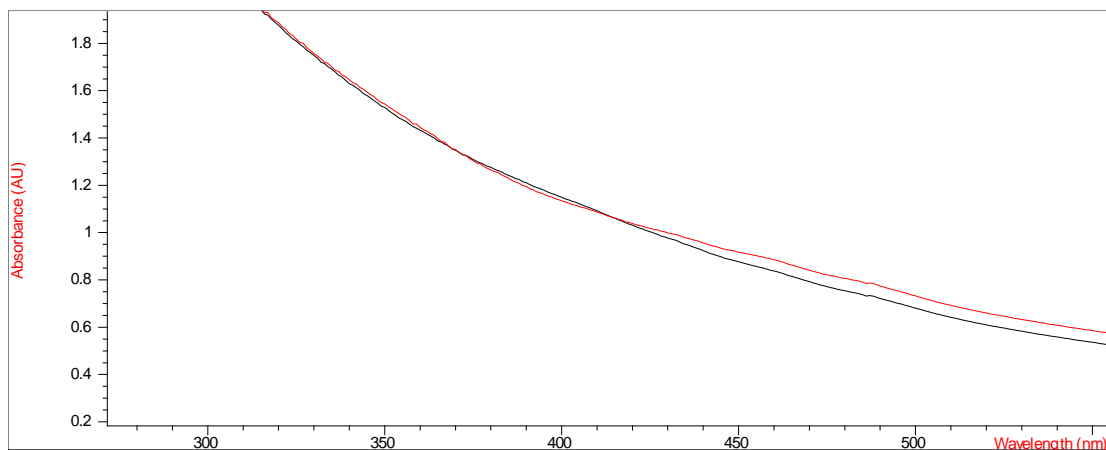
Uspoređen je sadržaj *o*-difenola za dva različita postupka ekstrakcije, metanolom i acetonitrilom, uzorka ulja sorte Rosulja (Istra). Sadržaj *o*-difenola metanolnog ekstrakta ulja sorte Rosulja (Istra) iznosio je 184 ± 13 mg/kg, dok sadržaj *o*-difenola u acetonitrilnom ekstraktu ulja nije mogao biti kvantificiran jer su vrijednosti $A(U-B)$ bile ispod LOQ.

Metanolna otopina ekstrakta koji je pripremljen ekstrakcijom s acetonitrilom ulja sorte Rosulja čuvana je mjesec dana u hladnjaku na temperaturi od -20°C . Utvrđen je visok sadržaj *o*-difenola u uzorku (596 ± 95 mg/kg), dok sadržaj *o*-difenola nije mogao biti kvantificiran u metanolnom ekstraktu pripremljenom ekstrakcijom s acetonitrilom koji je analiziran neposredno nakon pripreme. Sadržaj *o*-difenola čuvane otopine gotovo je 3 puta viši u odnosu na sadržaj *o*-difenola metanolnog ekstrakta ulja sorte Rosulja pripremljenom ekstrakcijom s metanolom čiji je sadržaj izmjeren neposredno nakon pripreme (184 ± 13 mg/kg). Metanolni ekstrakt se nužno mora analizirati neposredno nakon pripreme jer dolazi do promjene sastava tijekom čuvanja. Budući da je riječ o otopini čije je otapalo lako hlapljivo, metanol, moguće je da se otopina ukoncentrirala.

U acetonitrilnim ekstraktima ulja sorte Rosulja (Istra), Vodnjanska crnica (Istra) te višesortno ulje (Istra), izmjerena je $A(U-B)$ iznad LOD, a ispod LOQ stoga njihov sadržaj nije bilo moguće kvantificirati. Budući da većini acetonitrilnih ekstrakata nije bilo moguće odrediti sadržaj *o*-difenola, postupak ekstrakcije acetonitrilom opisan u poglavlju 3.2.1.2. nije prikladan za ovu metodu određivanja sadržaja *o*-difenola. Korak odmašćivanja ekstrakta *n*-heksanom mogao bi biti razlog zašto je metanolnom ekstraktu ulja sorte Rosulja mogao biti određen sadržaj.



Slika 13. UV-VIS spektar uzorka metanolnog ekstrakta ulja sorte Rosulja s Na_2MoO_4 (crveno) i bez njega (crno). Sadržaj *o*-difenola se određuje iz razlike *A* crvenog i crnog spektra na 370 nm.



Slika 14. UV-VIS spektar uzorka acetonitrilnog ekstrakta višesortnog zadarskog ulja, s Na_2MoO_4 (crveno) i bez njega (crno), u kojemu nije bilo moguće odrediti sadržaj *o*-difenola.

4.2. ¹H NMR SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE

Provedena je ¹H NMR analiza sadržaja S-(E)-elenolida, oleokoronala i oleomisionala u uzorcima ulja sorte Rosulja (Istra), Vodnjanska crnica (Istra) te višesortnom ulju iz Istre i Zadra. Kvantifikaciji je prethodila ekstrakcija fenolnih spojeva postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1.2..

4.2.1. Sadržaj S-(E)-elenolida, oleokoronala i oleomisionala

Sadržaj S-(E)-elenolida, oleokoronala i oleomisionala određen je na temelju omjera integrala površine odgovarajućeg pika i protonskog signala siringaldehida na 9,81 ppm-a. Sadržaj oleokoronala određen korištenjem integrala pika enolnog protona na 11,74 ppm-a (I_1) uz korištenje jednadžbe $c_{OK} = 4 \cdot (232,7 \cdot I_1 + 4,3)$. Sadržaj oleomisionala određen je korištenjem integrala površine ispod pika enolnog protona na 11,8 ppm-a (I_2) iz jednadžbe $c_{OM} = 4 \cdot (243,5 \cdot I_2 + 4,57)$. Sadržaj S-(E)-elenolida određen je korištenjem površine ispod pika protona elenolida na 9,27 ppm-a (I_3) iz jednadžbe $c_{EL} = 618 \cdot I_3 - 4,9$. Rezultati su iskazani u mg po kg maslinovog ulja.

Tablica 5. Koncentracije S-(E)-elenolida u ispitivanim uzorcima ulja.

	S-(E)-elenolid			
	Rosulja	Vodnjanska crnica	Višesortno Istra	Višesortno Zadar
I_{11}	1,4458	0,8758	0,7391	0,0750
I_{12}	1,5142	0,8019	0,8111	0,0709
\bar{I}_1	1,4800	0,8389	0,7751	0,0730
SD	0,0480	0,0523	0,0509	0,0029
RSD (%)	3,2	6,2	6,6	4,0
c (mg/kg)	910	513	474	40

Tablica 6. Koncentracije oleokoronala u ispitivanim uzorcima ulja.

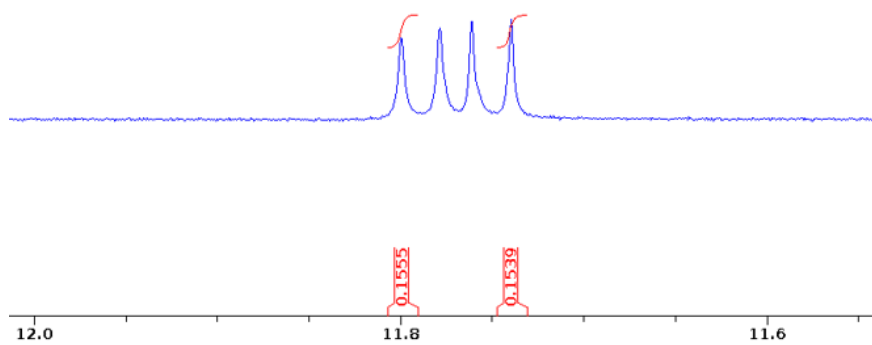
	Oleokoronal			
	Rosulja	Vodnjanska crnica	Višesortno Istra	Višesortno Zadar
<i>I</i> ₂₁	0,1574	0,0872	0,0473	<LOD
<i>I</i> ₂₂	0,1539	0,0784	0,0506	
\bar{I}_2	0,1557	0,0828	0,0490	
SD	0,0025	0,0062	0,0023	
RSD (%)	1,6	7,5	4,7	
<i>c</i> (mg/kg)	162	94	63	

Tablica 7. Koncentracije oleomisionala u ispitivanim uzorcima ulja.

	Oleomisional			
	Rosulja	Vodnjanska crnica	Višesortno Istra	Višesortno Zadar
<i>I</i> ₃₁	0,1538	0,0858	0,0175	<LOD
<i>I</i> ₃₂	0,1555	0,0745	0,0190	
\bar{I}_3	0,1547	0,0802	0,0183	
SD	0,0012	0,0080	0,0011	
RSD (%)	0,8	10,0	6,0	
<i>c</i> (mg/kg)	169	96	36	

Sadržaj S-(E)-elenolida varira od sorte do sorte u rasponu od 40-910 mg/kg, sadržaj oleokoronala u rasponu od 63-162 mg/kg te sadržaj oleomisionala u rasponu od 36-169 mg/kg ulja. Najviši sadržaj oleokoronala, oleomisionala te S-(E)-elenolida određen je u uzorku ulja sorte Rosulja, zatim po sadržaju slijedi ulje sorte Vodnjanska crnica, a potom višesortno ulje Istra. Najmanji sadržaj S-(E)-elenolida određen je u višesortnom ulju Zadar (40 mg/kg), dok pikovi oleokoronala i oleomisionala nisu niti bili vidljivi na spektru.

S-(E)-elenolid se nalazi se znatno većim količinama u odnosu na oleokoronala i oleomisionala u svakom od uzoraka ulja. Sadržaj oleokoronala i oleomisionala je otprilike podjednak, odnosno uz neznatno veću količinu oleomisionala u uzorcima sorte Rosulja i Vodnjanska crnica. U višesortnom istarskom ulju je sadržaj oleokoronala (63 mg/kg) znatno viši u odnosu na oleomisionala (36 mg/kg). Izmjerene vrijednosti S-(E)-elenolida odgovaraju vrijednostima opisanim u literaturi (Rikagou i sur., 2019). Zasad u literaturi nema uvida o sadržaju ovih spojeva u hrvatskim maslinovim uljima.



Slika 15. ¹H NMR spektar uzorka ulja sorte Rosulja. Signali su integrirani uz ručnu korekciju bazne linije. Lijevi integral odgovara površini ispod pika enolnog protona oleomisionala. Desni integral odgovara površini ispod pika enolnog protona oleokoronala.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada analitički su obrađeni uzorci maslinovih ulja. Utvrđena je ponovljivost metode ekstrakcije acetonitrilom na temelju usporedbe sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida te *o*-difenola 2 ekstrakta istog ulja, uz RSD 3,7 %, 1,4 % redom. Na isti način su uspoređene dvije metode ekstrakcije. Dobivena je razlika u sadržaju polifenola, 579 mg/kg u acetonitrilnom te 521 mg/kg u metanolnom ekstraktu koja je možda posljedica velike standardne devijacije koja je dobivena u slučaju acetonitrilnog ekstrakta, te je za pouzdani rezultat potrebno izvesti dodatna mjerenja. Dobiveno je dobro slaganje sadržaja ukupnih flavonoida u dva ekstrakta, 321 mg/kg u acetonitrilnom te 318 mg/kg u metanolnom ekstraktu. U acetonitrilnom ekstraktu nije bilo moguće odrediti sadržaj *o*-difenola, dok je on u metanolnom ekstraktu iznosio 184 mg/kg. Općenito u svim acetonitrilnim ekstraktima nije bilo moguće odrediti sadržaj *o*-difenola, vjerojatno jer ekstrakt nije odmašćen, te ovako pripremljeni ekstrakti nisu prikladni za određivanje sadržaja *o*-difenola. Metanolni ekstrakt se mora nužno analizirati neposredno nakon pripreme jer dolazi do promjene sastava tijekom čuvanja. Spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i *o*-difenola, u sortama ulja Rosulja, Vodnjanska crnica, višesortno Istra te višesortno Zadar. Sadržaj polifenola varira od uzorka do uzorka u rasponu od 168-628 mg/kg, sadržaj flavonoida u rasponu od 102-380 mg/kg, a *o*-difenola u rasponu od 184-596 mg/kg.

¹H NMR spektroskopijom određen je sadržaj fenolnih spojeva, oleokornala, oleomisionala te S-(E)-elenolida u sortama Rosulja, Vodnjanska crnica, višesortno Istra te višesortno Zadar. Zasad u literaturi nema uvida o sadržaju ovih spojeva u hrvatskim uljima. Sadržaj S-(E)-elenolida varira od uzorka do uzorka u rasponu od 40-910 mg/kg, sadržaj oleokoronala u rasponu od 63-162 mg/kg te oleomisionala u rasponu od 36-169 mg/kg ulja.

6. LITERATURA

- Abdelrahman MH, Hussain RO, Shaheed DS, AbuKhader M, Khan SA. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and in vitro biological studies on fixed oil isolated from the waste pits of two varieties of *Olea europaea* L. *OCL*, 2019, 26, 28.
- Atkins P, de Paula J. Physical chemistry for the Life Sciences. Oxford, Oxford University Press, 2006, str. 604-623.
- Bajoub A, Pacchiarotta T, Hurtado-Fernández E, Olmo-García L, García-Villalba R, Fernández-Gutiérrez A, Mayboroda OA, Carrasco-Pancorbo A. Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective. *J Chromatogr A*, 2016, 1428, 267-279.
- 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.
- 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. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 2007a, 12(8), 1679-1719.
- Bunzel M, Schendel RR. Determination of (Total) Phenolics and Antioxidant Capacity in Food and Ingredients. U: Food Analysis (Food Science Text Series). Nielsen SS, urednici, Springer, 2017, 455-468.
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernandez-Gutierrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J Sep Sci*, 2005, 28, 837-858.
- Cook MT, Liang Y, Besch-Williford C, Goyette S, Mafuvadze B, Hyder SM. Luteolin inhibits progesterin-dependent angiogenesis, stem cell-like characteristics, and growth of human breast cancer xenografts. *Springerplus*, 2015, 4, 444.
- Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm glas*, 2010, 66, 195-207.
- del Caño-Ochoa S, Ruiz-Aracama A, Guillén Lorén MD. Potential of Nuclear Magnetic Resonance for a Discriminant Characterization of PDO VOOs. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2019, 121 (3), e1800137.
- Delgado AM, Issaoui M, Chammem N. Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods. *J AOAC Int*, 2019, 102(5), 1356-1364.

- Diamantakos P, Giannara T, Skarkou M, Melliou E, Magiatis P. Influence of Harvest Time and Malaxation Conditions on the Concentration of Individual Phenols in Extra Virgin Olive Oil Related to Its Healthy Properties. *Molecules*, 2020, 25(10), 2449.
- Diamantakos P, Velkou Killday K, Gimisis T, Melliou E, Magiatis P. Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil. *OLIVAE*, 2015, 122, 22-33.
- Garcia B, Coelho J, Costa M, Pinto J, Paiva-Martins F. A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils. *J Sci Food Agr*, 2013, 93, 1727–1732.
- García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Vázquez-Martín A, Oliveras-Ferraros C, Menéndez JA, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. A 2-D-HPLC-CE platform coupled to ESI-TOF-MS to characterize the phenolic fraction in olive oil. *Electrophoresis*, 2009, 30 (15), 2688-2701.
- García-Villalba R, Pacchiarotta T, Carrasco-Pancorbo A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Deelder AM, Mayboroda OA. Gas chromatography–atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. *J Chromatogr A*, 2011, 1218 (7), 959-971.
- Godoy-Caballero MP, Acedo-Valenzuela MI, Durán-Merás I, Galeano-Díaz T. Development of a non-aqueous capillary electrophoresis method with UV–visible and fluorescence detection for phenolics compounds in olive oil. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403, 279–290.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (3), 686.
- Guo Z, Jia X, Zheng Z, Lu X, Zheng y, Zheng B, Xiao J. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochem Rev*, 2018, 17, 1091–1110.
- Karkoula E, Skantzari A, Melliou E, Magiatis P. Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative ¹H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem*, 2012, 60, 11696–11703.
- Karkoula E, Skantzari A, Melliou E, Magiatis P. Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers. *J Agric Food Chem*, 2014, 62, 600–607.

- Kim D-O, Chun OK, Kim YJ, Moon H-Y, Lee CY. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 6509-6515.
- Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8, 634-646.
- López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Tresserra-Rimbau A, Quifer-Rada P, Jiménez B, Pérez M, Vallverdú-Queralt A. Effects of Organic and Conventional Growing Systems on the Phenolic Profile of Extra-Virgin Olive Oil. *Molecules*, 2019, 24 (10), 1986.
- Lozano-Castellón J, López-Yerena A, Olmo-Cunillera A, Jáuregui O, Pérez M, Lamuela-Raventós RM, Vallverdú-Queralt A. Total Analysis of the Major Secoiridoids in Extra Virgin Olive Oil: Validation of an UHPLC-ESI-MS/MS Method. *Antioxidants*, 2021; 10 (4), 540.
- Miloš J, ured. Handbook of Olive Oil: Phenolic Compounds, Production and Health Benefits. New York, Nova Science Publishers Inc, 2017, str. 21-23; 90-103.
- Nevado JJ, Peñalvo GC, Robledo VR, Martínez GV. New CE-ESI-MS analytical method for the separation, identification and quantification of seven phenolic acids including three isomer compounds in virgin olive oil. *Talanta*, 2009, 79 (5), 1238-1246.
- Nordeen SK, Bona BJ, Jones DN, Lambert JR, Jackson TA. Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercetin. *Horm Cancer*, 2013, 4 (5), 293-300.
- Određivanje struktura organskih spojeva 2016., <https://www.fkit.unizg.hr>, pristupljeno 13.6.2021.
- Olmo-Cunillera A, López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Pérez M. NMR spectroscopy: a powerful tool for the analysis of polyphenols in extra virgin olive oil. *J Sci Food Agric*, 2020, 100, 1842-1851.
- Pérez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*, 2016, 8, 659.
- Rigakou A, Diamantakos P, Melliou E, Magiatis P. S-(E)-Elenolide: a new constituent of extra virgin olive oil. *J Sci Food Agric*, 2019, 99 (12), 5319-5326.
- Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, Bernini R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 2019, 11(8), 1776.
- Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, Lucarini M, Santini A, Souto EB, Novellino E, Antolak H, Azzini E, Setzer WN, Martins N. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (6), 1305.

- Serrelli G, Deiana M. Biological Relevance of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Metabolites. *Antioxidants*, 2018, 7 (12), 170.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 299, 152–178.
- Spinska stanja i vanjsko magnetno polje 2011., <http://www.orgchemboulder.com>, pristupljeno 19.6.2021.
- Tasioula-Margari M, Tsabolatidou E. Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*, 2015, 4 (3), 548-562.
- 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.
- Uredba komisije (EU) br 432/2012., eur-lex.europa.eu, pristupljeno 10.6.2021.

7.SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Maslinovo ulje se, kao osnovna sastavnica mediteranske prehrane, dulji niz godina povezuje sa smanjenom učestalosti kroničnih upalnih bolesti, karcinoma te duljim životnim vijekom. Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje, maslinovo ulje je danas sinonim zdravog načina prehrane. Pozitivan učinak posljedica je povoljnog sastava masnih kiselina, prije svega oleinske kiseline, te biološki aktivne polifenolne frakcije. Od pozitivnih učinaka može se istaknuti antioksidativna aktivnost, antikarcinogeni i imunomodulatorni učinak, kardioprotektivno djelovanje i antimikrobni učinak. Cilj ovog diplomskog rada bio je spektrofotometrijskim metodama sadržaj ukupnih fenola, flavonoida te *o*-difenola te ¹H NMR spektroskopijom odrediti sadržaj polifenola oleokoronala, oleomisionala te S-(E)-elenolida, odabranih uzoraka hrvatskih maslinovih ulja. Sadržaj ukupnih polifenola određen je korištenjem Folin Ciocalteu reagensa, sadržaj ukupnih flavonoida korištenjem AlCl₃ i NaNO₂, a sadržaj *o*-difenola Na₂MoO₄ reagensa. Utvrđeno je da sadržaj polifenola varira od uzorka do uzorka u rasponu od 168-628 mg/kg, sadržaj flavonoida od 102-380 mg/kg te sadržaj *o*-difenola u rasponu od 184-596 mg/kg. Na temelju usporedbe sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida te *o*-difenola ispitana je ponovljivost metode ekstrakcije acetonitrilom. Utvrđena je dobra ponovljivost metode s pogreškom manjom od 4 %. Na isti način uspoređene su dvije metode ekstrakcije. Dobiveno je dobro slaganje u sadržaju flavonoida, dok je sadržaj polifenola acetonitrilnog ekstrakta bio značajno viši od sadržaja metanolnog ekstrakta. Uzorci priređeni postupkom ekstrakcije acetonitrilom nisu prikladni za određivanje *o*-difenola NaMoO₄ reagensom. Metanolni ekstrakt se mora nužno analizirati neposredno nakon pripreme jer dolazi do promjene sastava tijekom čuvanja. Oleokoronal, oleomisional i S-(E)-elenolid su po prvi put određivani u hrvatskim maslinovim uljima. Sadržaj S-(E)-elenolida varira od uzorka do uzorka u rasponu od 40-910 mg/kg, sadržaj oleokoronala u rasponu od 63-162 mg/kg te sadržaj oleomisionala u rasponu od 36-169 mg/kg ulja.

7.2. Summary

Olive oil, as a basic component of the Mediterranean diet, has for long been associated with a reduced incidence of chronic inflammatory diseases and cancer as well as longer life expectancy. Due to its positive health effects, olive oil today is synonymous with healthy eating habits. The positive effect is due to the favorable fatty acid composition, primarily oleic acid, as well as biologically active polyphenolic fraction. Among positive effects, their antioxidant activity, anticarcinogenic, immunomodulatory, cardioprotective and antimicrobial effect can be highlighted. The purpose of this diploma thesis was to determine total phenolic, flavonoid and *o*-diphenol content by UV-Vis spectrophotometry and to determine content of S-(E)-elenolide, oleokoronal and oleomissional by ¹H NMR spectrophotometry in selected samples of Croatian olive oils. Total phenolic content was determined using F-C reagent, total flavonoid content using AlCl₃ and NaNO₂, while *o*-diphenol content was determined using Na₂MoO₄. Total phenolic content varies in range 168-628 mg/kg, total flavonoid content in range 102-380 mg/kg and *o*-diphenol content in range 184-596 mg/kg of olive oil. Based on the comparison of the content of total polyphenols, total flavonoids and *o*-diphenols, the repeatability of the acetonitrile extraction method was examined. Good repeatability of the method with an error of less than 4% was found. Two extraction methods were compared in the same way. A good agreement was obtained in the flavonoid content, while the polyphenol content of the acetonitrile extract was significantly higher than the methanol extract content. Samples prepared by the acetonitrile extraction process were found to be unsuitable for the determination of *o*-diphenol with NaMoO₄ reagent. Methanol extract has to be analysed immediately after the preparation as the content changes during storage. Content of oleokoronal, oleomissional and S-(E)-elenolide were determined, for the first time in Croatian olive oils. S-(E)-elenolide content varies in range 40-910 mg/kg, oleokoronal content in range of 63- 162 mg/kg and oleomissional content in range of 36-169 mg/kg of olive oil.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTACION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UV-Vis I NMR analiza polifenolnih sastavnica maslinovog ulja

Matea Križanić

SAŽETAK

Maslinovo ulje se, kao osnovna sastavnica mediteranske prehrane, dulji niz godina povezuje sa smanjenom učestalosti kroničnih upalnih bolesti, karcinoma te duljim životnim vijekom. Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje, maslinovo ulje je danas sinonim zdravog načina prehrane. Pozitivan učinak posljedica je povoljnog sastava masnih kiselina, prije svega oleinske kiseline, te biološki aktivne polifenolne frakcije. Od pozitivnih učinaka može se istaknuti antioksidativna aktivnost, antikarcinogeni i imunomodulatorni učinak, kardioprotektivno djelovanje i antimikrobni učinak. Cilj ovog diplomskog rada bio je spektrofotometrijskim metodama sadržaj ukupnih fenola, flavonoida te *o*-difenola te ¹H NMR spektroskopijom odrediti sadržaj polifenola oleokoronala, oleomisionala te S-(E)-elenolida, odabranih uzoraka hrvatskih maslinovih ulja. Sadržaj ukupnih polifenola određen je korištenjem Folin Ciocalteu reagensa, sadržaj ukupnih flavonoida korištenjem AlCl₃ i NaNO₂, a sadržaj *o*-difenola Na₂MoO₄ reagensa. Utvrđeno je da sadržaj polifenola varira od uzorka do uzorka u rasponu od 168-628 mg/kg, sadržaj flavonoida od 102-380 mg/kg te sadržaj *o*-difenola u rasponu od 184-596 mg/kg. Na temelju usporedbe sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida te *o*-difenola ispitana je ponovljivost metode ekstrakcije acetonitrilom. Utvrđena je dobra ponovljivost metode s pogreškom manjom od 4 %. Na isti način uspoređene su dvije metode ekstrakcije. Dobiveno je dobro slaganje u sadržaju flavonoida, dok je sadržaj polifenola acetonitrilnog ekstrakta bio značajno viši od sadržaja metanolnog ekstrakta. Uzorci priređeni postupkom ekstrakcije acetonitrilom nisu prikladni za određivanje *o*-difenola NaMoO₄ reagensom. Metanolni ekstrakt se mora nužno analizirati neposredno nakon pripreme jer dolazi do promjene sastava tijekom čuvanja. Oleokoronal, oleomisional i S-(E)-elenolid su po prvi put određivani u hrvatskim maslinovim uljima. Sadržaj S-(E)-elenolida varira od uzorka do uzorka u rasponu od 40-910 mg/kg, sadržaj oleokoronala u rasponu od 63-162 mg/kg te sadržaj oleomisionala u rasponu od 36-169 mg/kg ulja.

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

Rad sadrži: 43 stranica, 15 grafičkih prikaza, 7 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Gljučne riječi: Maslinovo ulje, UV-Vis spektroskopija, ¹H NMR spektroskopija, polifenoli, *o*-difenoli, flavonoidi

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Monika Barbarić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Viktor Pilepić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

UV-Vis and NMR analysis of olive oil phenolic compounds

Matea Križanić

SUMMARY

Olive oil, as a basic component of the Mediterranean diet, has for long been associated with a reduced incidence of chronic inflammatory diseases and cancer as well as longer life expectancy. Due to its positive health effects, olive oil today is synonymous with healthy eating habits. The positive effect is due to the favorable fatty acid composition, primarily oleic acid, as well as biologically active polyphenolic fraction. Among positive effects, their antioxidant activity, anticarcinogenic, immunomodulatory, cardioprotective and antimicrobial effect can be highlighted. The purpose of this diploma thesis was to determine total phenolic, flavonoid and *o*-diphenol content by UV-Vis spectrophotometry and to determine content of S-(E)-elenolide, oleokoronal and oleomissional by ¹H NMR spectrophotometry in selected samples of Croatian olive oils. Total phenolic content was determined using F-C reagent, total flavonoid content using AlCl₃ and NaNO₂, while *o*-diphenol content was determined using Na₂MoO₄. Total phenolic content varies in range 168-628 mg/kg, total flavonoid content in range 102-380 mg/kg and *o*-diphenol content in range 184-596 mg/kg of olive oil. Based on the comparison of the content of total polyphenols, total flavonoids and *o*-diphenols, the repeatability of the acetonitrile extraction method was examined. Good repeatability of the method with an error of less than 4% was found. Two extraction methods were compared in the same way. A good agreement was obtained in the flavonoid content, while the polyphenol content of the acetonitrile extract was significantly higher than the methanol extract content. Samples prepared by the acetonitrile extraction process were found to be unsuitable for the determination of *o*-diphenol with NaMoO₄ reagent. Methanol extract has to be analysed immediately after the preparation as the content changes during storage. Content of oleokoronal, oleomissional and S-(E)-elenolide were determined, for the first time in Croatian olive oils. S-(E)-elenolide content varies in range 40-910 mg/kg, oleokoronal content in range of 63- 162 mg/kg and oleomissional content in range of 36-169 mg/kg of olive oil.

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

Thesis includes: 43 pages, 16 figures, 7 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive oil, UV-Vis spectroscopy, ¹H NMR spectroscopy, polyphenols, *o*-diphenols, flavonoids

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

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

The thesis was accepted: September 2021.