HPLC-DAD i NMR analiza polifenola u maslinovom ulju

Burčak, Leona

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:163:086895

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Leona Burčak

HPLC-DAD i NMR analiza polifenola u maslinovom ulju

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fizikalna kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom mentorica doc. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala i izv. prof. dr. sc. Monike Barbarić.

Najljepše zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Cvijeti Jakobušić Brali i izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić na pruženoj prilici i velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Velike zahvale želim iskazati svim svojim kolegama s godine, koji su sa mnom u proteklih pet godina dijelili studentske brige, bili mi iznimna podrška i kolege kakve se samo mogu poželjeti.

Posebna zahvala ide mojoj Dariji, bez čije radne sobe možda nikad ne bi bilo ovog diplomskog rada.

I najveće zahvale idu mojoj mami, tati i bratu Mateju, koji se uvijek vjerovali u mene, pomagali mi, podupirali me i ohrabrivali.

SADRŽAJ

1) UVOD 1
1.1. Maslinovo ulje – zdrava tradicija Mediterana 1
1.1.1. Sastav maslinova ulja 2
1.1.2. Polifenoli u maslinovu ulju 4
1.2. HPLC kromatografija 8
1.2.1. Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 9
1.2.2. Kvantitativna HPLC analiza 13
1.3. Princip NMR spektroskopije 14
1.3.1. NMR spektrometar 18
2) OBRAZLOŽENJE TEME 20
3) MATERIJALI I METODE 21
3.1. Materijali 21
3.1.1. Uzorci maslinova ulja 21
3.1.2. Kemikalije 21
3.1.3. Instrumenti 21
3.1.4. Pribor 22
3.1.5. Programski paketi 22
3.2. Metode 22
3.2.1. Ekstrakcija 23
3.2.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće potpomognuta ultrazvukom (za potrebe HPLC analize) 23
3.2.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (za potrebe NMR analize) 23
3.2.2. Priprema otopina standarda za HPLC analizu 24
Priprema mobilne faze 25
3.2.3. Identifikacija polifenola i određivanje koncentracije HPLC analizom 25
3.2.4. Priprema otopina standarda za NMR analizu 28
Priprema otopine siringaldehida 28
3.2.5. Identifikacija polifenola i određivanje koncentracije NMR analizom 28
4) REZULTATI I RASPRAVA 30
4.1. HPLC analiza fenolnih ekstrakata 30
4.2. ^{1}H NMR spektar fenolnih ekstrakata 32
4.3. Usporedba ekstrakcijskih postupaka 34
5) ZAKLJUČAK 37
6) LITERATURA 38
7) SAŽETAK/SUMMARY 43

1) UVOD

1.1. Maslinovo ulje – zdrava tradicija Mediterana

Maslinovo ulje namirnica je koja već godinama intrigira znanstvenike i nutricioniste zbog širokog spektra pozitivnih učinaka na organizam. Zahvaljujući popularizaciji mediteranske prehrane, poznate još i pod nazivom mediteranska dijeta, ova tradicionalna namirnica mediteranskog podrijetla napokon dobiva pozornost koju zaslužuje. Zahvaljujući istraživanjima koja potvrđuju veliku dobrobit maslinova ulja za ljudski organizam, ono se sve češće koristi u pripremi hrane širom svijeta. Iako se čovjekov životni vijek u razvijenim zemljama zahvaljujući napretku medicine i poboljšanju higijenskog standarda značajno produljio, ipak i dalje značajan dio populacije podliježe bolestima koje povezujemo sa životnim stilom i starijom životnom dobi. Neki su od primjera različite neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti i dijabetes tipa 2 (Rigacci i Stefani, 2016). U porastu je i pojava različitih tumorskih oboljenja. Ovi komorbiditeti modernog načina života posljednjih su desetljeća pod velikim povećalom znanstvenika. Jedan od pristupa koji se sve češće koristi prilikom nošenja s ovim bolestima je skretanje fokusa s njihova liječenja na njihovu prevenciju promjenom životnih navika. Studija sedam država (Keys i sur., 1986) provedena 70-ih godina prošlog stoljeća pokazala je da je očekivan životni vijek naroda mediteranskog podneblja jedan od najviših u svijetu, a incidencija različitih kroničnih inflamatornih bolesti među najnižima. Promatranjem ishrane ovih naroda uočena je masovna, redovita konzumacija maslinova ulja te se upravo to dovelo u vezu s vitalnošću stanovnika Sredozemlja (Parkinson i Cicerale, 2016). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) 2011. godine prihvatila je zdravstvenu tvrdnju da je svakodnevni unos barem 5 mg (poli)fenola iz djevičanskog maslinova ulja prehranom može zaštititi lipide u krvi od oksidativna oštećenja. Ovo pozitivno svojstvo maslinova ulja prepoznala je i FDA (*Food and Drug Administration*) te ga je uvrstila u kategoriju dodataka prehrani, navodeći da dnevna konzumacija oko dvije žlice, odnosno 23 grama maslinova ulja može smanjiti rizik od koronarne bolesti srca (Sinesi i Damato, 2021.). Studija De Santisa i sur. upućuje na to da sorte maslinova ulja s karakterističnim visokim sadržajem polifenola mogu djelovati na transkripciju i moduliranje ekspresije različitih miRNA transkripata uključenih u brojne biokemijske procese (na primjer proliferacija stanica, metabolizam glukoze i lipida), pa polifenoli pokazuju izniman značaj za proučavanje u daljnjim nutrigenomskim istraživanjima.

1.1.1. Sastav maslinova ulja

Specifičnost maslinova ulja leže u njegovu kemijskom sastavu. Kemijski sastav maslinova ulja, organoleptička svojstva, prehrambena i tržišna vrijednost ovise o različitim agronomskim i tehničkim čimbenicima.

Gruba podjela sastavnica maslinova ulja je na glicerolnu ili osapunjivu frakciju (90 – 99 %) te neglicerolnu ili neosapunjivu frakciju (0,4 – 5 %).

Glicerolna frakcija okosnica je maslinova ulja u prehrambenom smislu. Čine ju trigliceridi, monogliceridi, fosfatidi i slobodne masne kiseline. Hidrolizom (lipolizom) triglicerida oslobađaju se masne kiseline, a posljedica je pad kvalitete ulja. Povećanje razine masnih kiselina sazrijevanjem povezuje se s povećanjem aktivnosti lipolitičkog enzima i smanjenjem aktivnosti enzima lipooksigenaze. Masne kiseline prisutne u maslinovu ulju (uglavnom do 95 %) esterificirane su za glicerol u obliku triglicerida. Jedna je od glavnih specifičnosti (odrednica) svakog maslinova ulja prisutnost i/ili odsutnost pojedinih masnih kiselina u sastavu ulja. Masne kiseline koje se nalaze u sastavu maslinova ulja uglavnom imaju 12 – 24 ugljikova atoma. Najveći udio čine masne kiseline sa 16 i 18 ugljikovih atoma koje mogu biti zasićene ili različita stupnja nezasićenosti u *cis* konformaciji. Sastav masnih kiselina u maslinovu ulju prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Udio masnih kiselina u maslinovu ulju (Boskou, 2006)

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

Iz navedenih vrijednosti zaključuje se da maslinovo ulje visoke kakvoće sadrži (Wani i sur., 2018; Žanetić i Gugić, 2006):

- visok udio oleinske kiseline (70 – 80 %)
- oko 16 % zasićenih masnih kiselina (palmitinska i stearinska kiselina)
- 8 – 10 % višestruko nezasićenih esencijalnih masnih kiselina (linolna i α-linolenska kiselina).

Iako su prisutne u malim količinama, linolna i linoleinska kiselina važne su komponente maslinova ulja jer su esencijalne masne kiseline (moraju se unositi hranom jer ih ljudski organizam ne može sam sintetizirati). Takav sastav masnih kiselina razlikuje maslinovo ulje od drugih jestivih masti i ulja. Iako sadrži iste masne kiseline kao i ostala ulja i masti, specifičnost je u omjeru masnih kiselina (Tablica 1). Tako omjer linolne i linolenske kiseline u maslinovu ulju odgovara omjeru tih kiselina u majčinu mlijeku, pa se korištenje maslinova ulja preporučuje već u prehrani dojenčadi. Veća koncentracija mononezasićenih masnih kiselina nego polinezasićenih čini maslinovo ulje otpornijim na oksidaciju u usporedbi s ostalim uljima na tržištu (Lopez i sur., 2004).

Sastav manje zastupljene neglicerolne ili neosapunjive frakcije čini više od 200 spojeva različitih struktura kao što su alifatski i triterpenski alkoholi, ugljikovodici, steroli, hlapljivi spojevi, karotenoidi, fenolni spojevi, tokoferoli, voskovi i dr. To su sve redom sekundarni produkti metabolizma stabla i ploda masline. Dok neki od ovih sastojaka maslinova ulja imaju terapijski učinak, drugi predstavljaju osnovni element arome ulja (mirisi, okusi), a velika skupina spojeva (primarno polifenoli) imaju antibakterijsko, protuupalno i antioksidativno djelovanje (Sánchez de Medina i sur., 2015).

Hidrofilni fenolni spojevi iz maslinova ulja zaslužni su za većinu ljekovitih svojstava koji se pripisuju maslinovu ulju. Detaljno o polifenolima bit će riječi u poglavlju 1.1.2.

Ugljikovodici sačinjavaju oko 60 % neosapunjiva dijela maslinova ulja i najzastupljenija su skupina spojeva neosapunjive frakcije. 60 – 70 % ukupnih ugljikovodika odnosi se na skvalen, što maslinovo ulje čini biljnim uljem koje ima najveću zabilježenu koncentraciju skvalena. Skvalen je važan biokemijski prekursor u sintezi sterola kao što je *β*-sitosterol, čija je jedna od uloga ometanje crijevne apsorpcije kolesterola. Tetraciklički steroli nastali biosintezom iz skvalena imaju ulogu prirodnih antioksidansa i inhibiraju proces kvarenja ulja. Skladištenjem njihov se sadržaj smanjuje, što smanjuje kvalitetu ulja. Preostali dio ugljikovodika u maslinovu ulju čine zasićeni alifatski ugljikovodici i dienski ugljikovodici, koji su važni za dokazivanje

autentičnosti i kakvoće. Maslinovo ulje sadrži i alifatske i triterpenske alkohole, koji imaju ulogu intermedijera u transformacijama koje se odnose na skvalen i prethode nastajanju sterola.

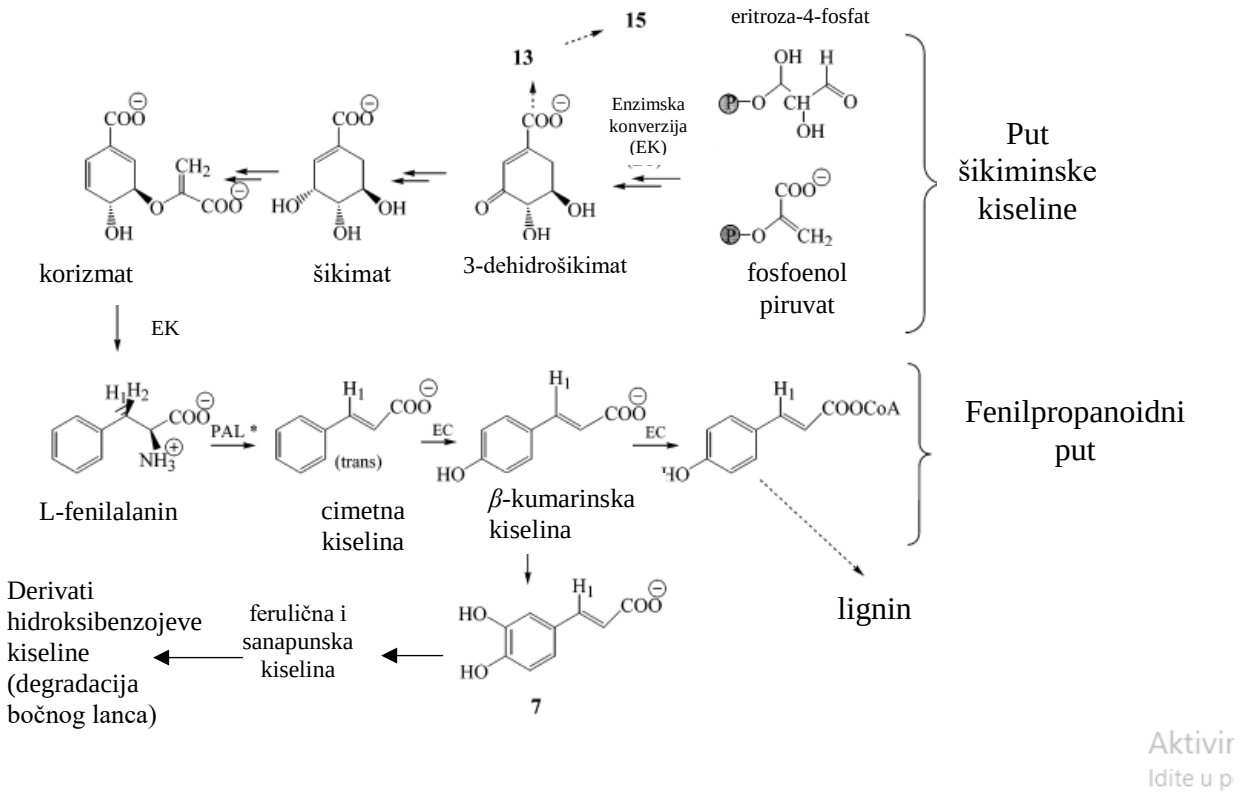
Od ostalih važnih sastavnica izdvajaju se tokoferoli. Maslinovo ulje sadrži α, β, γ i δ oblike, od kojih je najzastupljeniji α-oblik (vitamin E), koji ujedno ima i najznačajniju biološku aktivnost. Koncentracija tokoferola u maslinovu ulju uvelike ovisi o sorti masline, klimatskim prilikama na području uzgoja maslina, korištenu postupku ekstrakcije maslinova ulja i zrelosti maslina (Debbabi i sur., 2016).

Sastav i koncentracija pigmenata u plodu masline određuju koncentraciju i sastav pigmenata koji se nakon prerade masline mogu odrediti u maslinovu ulju. Klorofil je zelen, najzastupljeniji pigment u maslinovu ulju koji mu daje karakterističnu boju. Maslinovo ulje dobiveno preradom zelenih plodova ima više klorofila i izraženiju zelenu boju. Osim klorofila, masline sadrže karotene, ksantofile i antocijane, čija se koncentracija mijenja tijekom procesa zrenja masline. U tami ovi pigmenti djeluju kao antioksidansi, dok u prisutnosti svjetla pospješuju oksidaciju ulja. S obzirom na to da su neki karoteni prekursori vitamina A, pigmenti doprinose prehrambenoj i komercijalnoj vrijednosti maslinova ulja. U dostupnoj literaturi može se pronaći više od 90 tzv. „spojeva arome“, a odnose se na aldehide, ketone, estere itd. (Criado i sur., 2008; Žanetić i Gugić, 2006).

1.1.2. Polifenoli u maslinovu ulju

Polifenoli su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina (-OH) vezanih izravno na jedan ili više aromatskih ugljikovodika. Prirodni bioaktivni polifenoli spojevi su različitih kemijskih struktura. Njihova je zajednička opća formula ArOH, gdje je Ar fenil, supstituirani fenil ili neka druga arilna skupina. Najveći su izvor polifenola biljke, pa je tako više od 8000 polifenolnih sastavnica otkriveno u raznim biljnim vrstama. Na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava polifenoli se kategoriziraju na flavonoide i neflavonoide (Pandey i Rizvi, 2009). Svi polifenoli kao sekundarni metaboliti biljaka nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora, šikiminske kiseline (Slika 1.). Biosinteza šikiminske kiseline kreće s eritroza-4-fosfatom (potječe iz puta pentozafosfata), koji reagira s fosfoenol-piruvatom. Radi se o aldolnoj reakciji između nukleofilnog enola (fosfoenol-piruvata) i elektrofilnog aldehida (eritroze-4-fosfata). Nastali fosfatni ester hidrolizira, nakon čega se oslobađa keto-skupina. Nakon napada kisika s drugog dijela molekule dolazi do zatvaranja prstena. Fosforiliranjem šikimata pomoću molekule ATP kataliziranim šikimatkinazom nastaje šikimat-3-fosfat. Fosfoenol-piruvat u reakciji

kataliziranoj s 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat-sintazom (EPSP-sintazom) sa šikimat-3-fosfatom daje 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat (EPSP, 9) kao produkt. Posljednji je korak u putu šikiminske kiseline pretvorba EPSP 9 u korizmat, a reakciju katalizira korizmat-sintaza.Većina fenolnih kiselina derivati su trans-cimetne kiseline formirane deaminacijom *L*-fenilalanina uz enzim *L*-fenilalaninamonijliaze (PAL). Enzim PAL povezuje primarni (biosintetski put šikiminske kiseline) sa sekundarnim metabolizmom (fenilpropanoidni biosintetski put) te ima ključnu ulogu u regulaciji sinteze fenolnih sekundarnih metabolita (Robbins RJ, 2003).



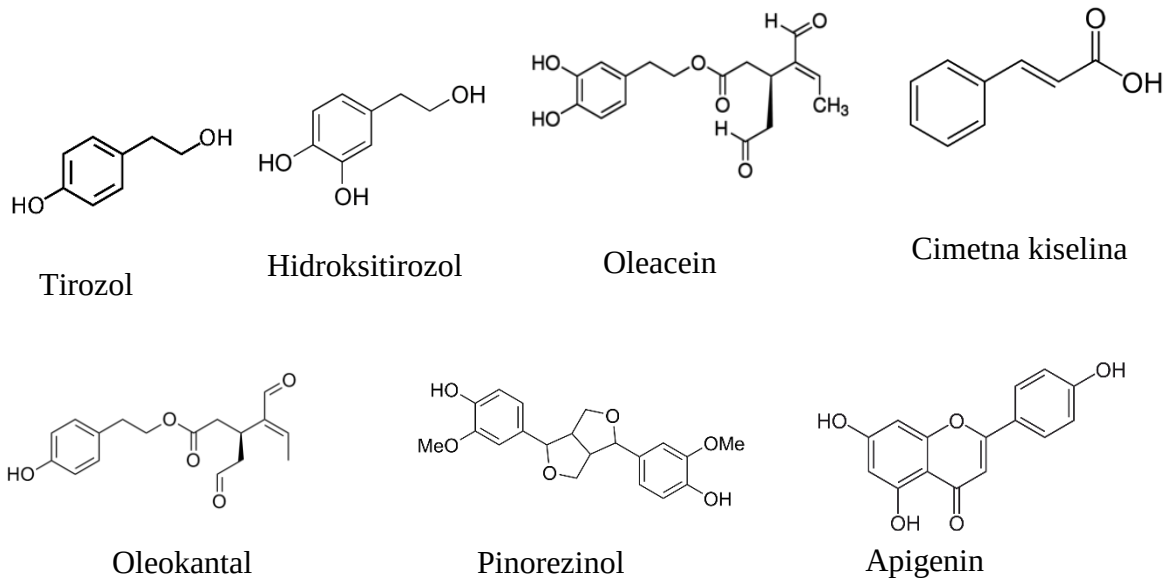
Slika 1. Put šikiminske kiseline uz prilagodbu preuzeto iz Robbins RJ, 2003.

Biljka sintetizira fenole kao odgovor na biotički ili abiotički stres. Glavne funkcije koje se pripisuju fenolima u biokemiji biljaka su:

- <u>Zaštita od UV zračenja</u>: Fenoli štite biljke od ultraljubičastih B zraka (UV-B) (280 – 320 nm). Flavonoidi imaju apsorpcijske maksimume u području 250 – 270 nm i 335 – 360 nm te tako štite od štetnog UV zračenja. Antioksidacijskom aktivnošću fenolni spojevi sprečavaju mutagenezu i smrt stanice do koje dolazi uslijed dimerizacije jedinica timina u DNA, koji apsorbiraju svjetlost valne duljine 260 nm. Također, sprečavaju razgradnju koenzima NAD i NADP do koje dolazi uslijed apsorpcije svjetlosti valne duljine 260 nm.

- Pigmentacija cvijeća i plodova: Neki fenoli, poput antocijana, kalkona ili flavona, djeluju kao pigmenti u cvijeću i plodovima, što ima važnu ulogu u privlačenju životinja koje sudjeluju u oprašivanju ili utječe na boju plodova koje životinje jedu. Životinje kasnije izmetom rasprostranjuju neprobavljene sjemenke.
- Zaštita od patogena: Utvrđena je povezanost koncentracije fenola u biljci s njezinom otpornošću na gljivične, bakterijske i virusne patogene.
- Zaštita od biljojeda: Fenoli smanjuju pa čak i uništavaju ugodan okus biljke, što ih čini manje poželjnom hranom većini biljojeda.

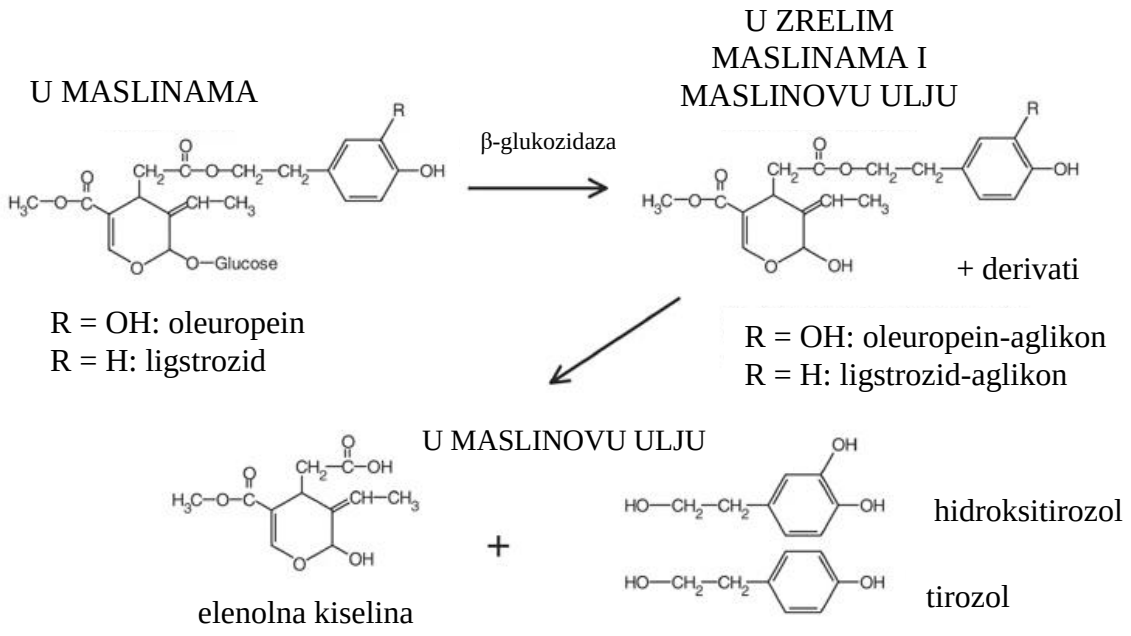
Fenolne spojeve, prisutne u maslinovu ulju, možemo podijeliti na: fenolne alkohole (hidroksitirozol i tirozol), fenolne kiseline i njihove derivate (kavena, galna, vanilinska, *p*-hidroksibenzojeva, ferulična, cimetna i benzojeva kiselina), sekoiridoide (oleuropein, oleokantal, oleacein, aglikon oleuropeina), lignane (pinoresinol) i flavonoide (apigenin i luteolin) (Servili i sur., 2014).



Slika 2. Kemijske strukture odabranih fenolnih spojeva prisutnih u maslinovu ulju

Fenolni spojevi prisutni u maslinovu ulju razlikuju se od onih u plodovima masline. Masline uglavnom sadrže polarne glikozide oleuropein i ligstrozid. Oleuropein je ester elenolne kiseline s 3,4′-dihidroksifeniletanolom (hidroksitirozol), a ligstrozid je ester elenolne kiseline s 4-

hidroksifeniletanolom (tirozol). Oleuropein i ligstrozid matični su spojevi manje polarnih oleuropein-aglikona i ligstrozid-aglikona. Oleuropein-anglikoni i ligstrozid-aglikoni nastaju uklanjanjem glukoznog dijela iz oleuropein-glikozida i ligstrozid-glikozida uz pomoć *β*-glukozidaze (De las Hazas i sur., 2018). Dozrijevanjem ploda masline raste aktivnost *β*-glukozidaze. Navedeni aglikoni i njihovi različiti derivati najčešći su fenolni spojevi u maslinovu ulju. Derivati se razlikuju po svojoj strukturi prstena koja može biti u dvama različitim oblicima: otvorena ili zatvorena (Owen i sur., 2000; Montedoro i sur., 1993). Polarni spojevi, hidroksitirozol i tirozol, krajnji su produkti hidrolize oleuropein-anglikona i ligstrozid-aglikona ili njihovih derivata u plodu masline i maslinovu ulju (Slika 3.). Tirozol, hidroksitirozol i njihovi sekoiridoidni derivati čine oko 90 % ukupnih fenola prisutnih u maslinovu ulju (Vissers i sur., 2004). Najčešće su te koncentracije između 100 – 300 mg/kg u ekstra djevičanskom ulju, ali zabilježene su i koncentracije čak i više od 1000 mg/kg (Jakobušić Brala i sur., 2015). Optimalni dnevni unos polifenola prehranom je 9 mg/dan (de la Torre, 2008) koji se unosi u organizam konzumacijom 25 – 50 mL ekstra djevičanskog maslinova ulja na dan (Segura-Carretero i Curiel, 2018).



Slika 3. Polifenoli u maslini i maslinovom ulju

Kemijski sastav maslinova ulja, organoleptička svojstva, prehrambena i tržišna vrijednost ovise o različitim agronomskim i tehničkim čimbenicima. Za potpuni razvoj zdravog stabla potrebni su: pogodan okoliš, odgovarajuća klima, pravilno navodnjavanje, kontrola berbe, redovito

obrezivanje, oprašivači, pravilna i pravovremena zaštita od nametnika i bolesti (Boskou, 2006). Osim agrotehničkih mjera, na kvalitetu maslinova ulja i njegov sastav, a time i biološki učinak, svakako utječe i sorta maslina (genetska predispozicija), stupanj dozrijevanja ploda, transport, uvjeti čuvanja, tehnološki postupci prerade maslina i skladištenje ulja (Šindrak i sur., 2007). Većina je fenolnih spojeva ambifilna. Raspodjeljuje se između lipidne (maslinovo ulje) i vodene faze (vegetabilna voda). Ovo svojstvo dovodi do toga da se i do 80 % fenolnih spojeva tijekom prerade ulja nepovratno gubi s vegetabilnom vodom u postupku prerade (Žanetić i Grugić, 2006). Jedan od važnijih učinaka polifenola u organizmu je antioksidativni učinak, koji pokazuje čak i pri njihovim niskim koncentracijama u samoj hrani (Franco i sur., 2014). Već i niske koncentracije fenola u hrani štitit će stanice od negativnih posljedica oksidacije. S antioksidanskih učinkom povezuju se brojnih učinci: antiarteriosklerotski, kardioprotektivni, neuroprotektivni, imunoprotektivni, antialergenski, antidijabetički, protuupalni, antimutageni i antikancerogeni učinak. (Sánchez de Medina i sur., 2015; Reboredo-Rodríguez i sur., 2015; Talhaoui i sur., 2014).

1.2. HPLC kromatografija

Kromatografija je fizikalno-kemijska tehnika odjeljivanja komponenti iz ispitivane smjese, a temelji se na različitoj distribuciji između mobilne i stacionarne faze. Sastavnice uzorka koji se analizira odjeljuju se ovisno o njihovoj (ne)polarnosti. Stacionarna faza dio je kromatografskog sustava, a može biti čvrsta, tekuća ili u obliku gela. Mobilna faza fluid je koji prolazi kroz stacionarnu fazu u određenom smjeru. U njoj je otopljen ispitivani uzorak čije komponente želimo odijeliti. Mobilna faza može biti tekućina (tekućinska kromatografija) ili plin (plinska kromatografija). HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) složeni je oblik tekućinske kromatografije gdje se sastavnice uzorka odjeljuju pomoću tekuće mobilne faze koja se provodi kroz kromatografsku kolonu napunjenu vrlo malim poroznim česticama (promjera 1 – 5 mm) pod umjereno visokim tlakom (tipično 50 – 350 bara). Analiti se detektiraju nakon što izađu iz kolone odgovarajućim detekcijskim uređajem. Završni je produkt kromatografske analize kromatogram, prikaz niza simetričnih eluacijskih krivulja (pikova) dobivenih mjerenjem signala i vremena izlaska (eluacije) pojedinog analita. Iz kromatograma očitavamo kvalitativnu vrijednost (detekcija) gledajući položaj pika, odnosno retencijsko vrijeme i kvantitativnu vrijednost (koncentracija) ovisno o površini ispod pika. Bazna linije predstavlja signal čiste mobilne faze. Postoje četiri

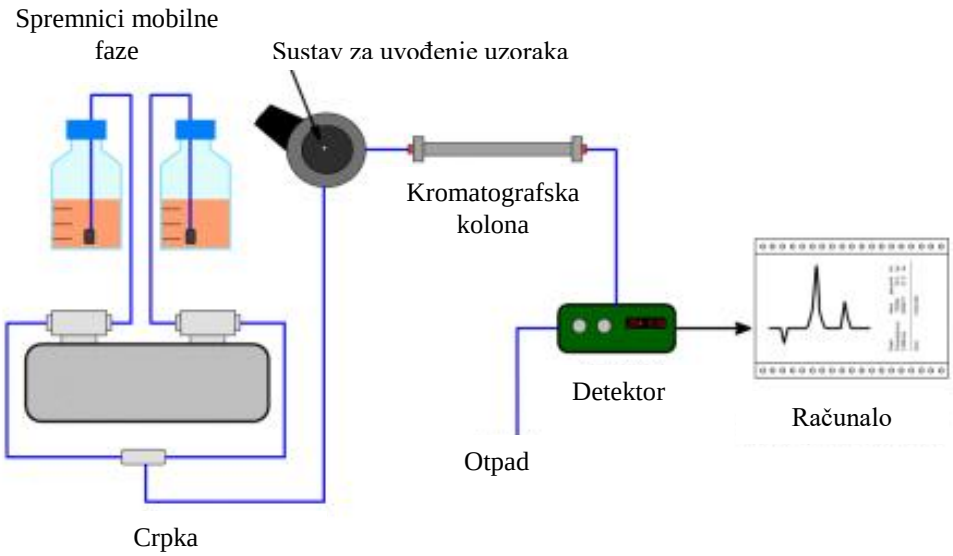
osnovne vrste HPLC tehnike: normalno fazna kromatografija (NP, engl. *normal phase chromatography*), obrnuta fazna kromatografija (RP, reversed phase chromatography), ionska kromatografija (IEX, engl. *ion exchange chromatography*) i gel filtracijska kromatografija (SEC, engl. *size-exclusion chromatography*) (Kazakevich i LoBrutto, 2007). U 75 % primjena HPLC-a danas koristi se obrnuta fazna kromatografija, a korištena je i u izradi ovog diplomskog rada. U kromatografiji obrnutih faza mobilnu fazu najčešće čini smjesa otapala poput vode, metanola, acetonitrila i/ili tetrahidrofurana različitih udjela kako bi se postiglo što efikasnije odjeljivanje analita. Da bi tehnika razdvajanja bila efikasna, mora biti u stanju razdvojiti smjese s velikim brojem sličnih analita i omogućiti kvalitativne i kvantitativne informacije o razdvojenim analitima. Zato veliku ulogu u postizanju najuspješnije separacije komponenti različitih uzoraka ima upravo postavljanje optimalnih uvjeta pri kojima se HPLC analiza provodi.

1.2.1. Princip rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Osnovne komponente HPLC uređaja koji se koristi u analitičke svrhe shematski su prikazane na Slici 4.

Uobičajeni HPLC kromatograf sastoji se od:

1) sustava za opskrbu otapalom (spremnik mobilne faze i sustav za uklanjanje plinova)
2) pumpe (za visoke tlakove)
3) injektora (sustava za uvođenje uzorka)
4) kolona za odjeljivanje (po mogućnosti sa predkolonom)
5) detektora
6) odgovarajućeg digitalnog sučelja (najčešće u obliku računala).



Slika 4. Shema HPLC sustava (Scherf-Clavel, 2016.)

Sustav opskrbe otapala ima jedan ili više spremnika za otapala koja se koriste kao mobilna faza. Spremnici mobilne faze, odnosno otapala, najčešće su napravljeni od čelika ili stakla i moraju biti čisti i inertni za otapala koja se u njima nalaze. Otapala koja se koriste kao mobilna faza trebaju biti visoke čistoće i treba iz njih ukloniti otopljene plinove ili suspendirane čestice kako mjehurići zraka ne bi ometali detekciju. Neki sustavi opskrbe otapala imaju mogućnost uklanjanja plinova iz otapala (degazer). Nepotrebni se plinovi mogu odstraniti pomoću mjehurića inertnog plina netopljivog u mobilnoj fazi, primjerice helija. Postoji i uređaj za otplinjavanje u kojem otapala prolaze kroz posebne polimerne cjevčice u vakuumskoj komori. Membrane cjevčica ostvaruju selektivnu propusnost plinova, a blagi vakuum stvoren pomoću male pumpe smanjuje sadržaj plinova iz otapala. Međutim, određeni problemi se mogu javiti jer polimerne cjevčice mogu apsorbirati specifične sastojke otapala i tako biti izvor kontaminacije kod zamjene jednog otapala drugim. Kad plinovi nisu uklonjeni, pa čak i ako pumpa radi ispravno, mogu se primijetiti fluktuacije tlaka (4 – 6 % nominalnog tlaka, dok su normalne fluktuacije ispod 0,1 % nominalnog tlaka). Otopljeni plinovi također mogu utjecati na injekcijski volumen kad se koriste mali volumeni uzorka (1 – 2 µl). Ovaj sustav također mora omogućiti konstantan protok otapala (mobilne faze) i mora ispravno miješati otapala ako se radi gradijentna analiza. Kod izokratne izvedbe (sastav mobilne faze isti je tijekom cijele kromatografije) ako se koristi čisto ili predmiješano otapalo potreban je samo jedan spremnik. Međutim, puno je praktičniji gradijentni sastav, uobičajen za HPLC, kod kojeg se sadržaj mobilne faze mijenja bilo skokovito bilo kontinuirano. Za ovaj sustav potrebna su dva ili više

otapala koja se miješaju pomoću crpke u različitim omjerima. Na taj se način pospješuje djelotvornost eluacije (Lutteroti, 2012; Skoog i sur., 1999).

Pumpa omogućuje konstantni protok otapala kroz injektor, kromatografsku kolonu i detektor. Također mora proizvoditi dovoljno visok tlak (50 – 350 bara) koji je potreban mobilnoj fazi za svladavanje otpora protoku kroz kolonu, a pritom mora održati stalnu brzinu protoka mobilne faze. Konstantan protok bez pulsiranja postiže se recipročnim pumpama (koje imaju i mogućnost primjene gradijentne eluacije) s više klipova. Uobičajeno se koriste binarne pumpe (najviše dva otapala) i kvaterne pumpe (najviše četiri otapala). Pumpe koje ispunjavaju kriterije za korištenje u HPLC sustavu (Skoog i sur., 1999):

- omogućuju brzinu protoka u rasponu 0,1 – 10 mL/min
- mogu izdržati tlak do 400 bara
- reproducibilnost protoka im je > 99,5 %
- imaju veliku otpornost na koroziju
- omogućuju izlaz uzorka bez pulsiranja zraka.

Glavna uloga sustava za unošenje uzorka je uvođenje u mobilnu fazu (na točan i reproducibilan način) precizno izmjerena volumena uzorka. Ovaj sustav dolazi u više varijanti. Jednostavniji, ali i nepouzdaniji način jest onaj koji prodire kroz septum na početku kolone, dok je modernija tehnologija razvila uređaje uz zaustavljanje protoka, sastavljene od plinskog ventila kroz koji se injekcijskom štrcaljkom na punilo unosi uzorak. Standardni dio ventila je i petlja koja regulira volumen unošenja. Još jedan tip injektora sastoji se od petlje određenog volumena u koju prvo ubacimo otopinu uzorka, a zatim pomoću preklopnog ventila uzorak prebacimo u protok otapala. Ovaj sistem dopušta ubacivanje ustaljena volumena jednaka volumenu petlje i tipičan je za ručne injektore (manualna mikrolitarska šprica). Ubrizgavanje različitih volumena može se izvesti upotrebom petlje većeg volumena, koja je onda djelomično ispunjena uzorkom.

Autosampler je uređaj koji automatizira uvođenje alikvota otopine uzorka u HPLC kolonu. HPLC autosampler tipično sadrži odjeljak za pohranu uzoraka s injektorom, koji se sastoji od ventila, uređaja za doziranje ili mjerenje uzorka i pokretne igle za uzorkovanje. Ako je prisutan autosampler kao dio opreme, postoji i opcija da se injektira više uzoraka za redom. Automatski injektori samostalno injektiraju uzorak iz željene bočice s alikvotom, što pojednostavljuje i ubrzava rad (Moldoveanu i David, 2012).

Kromatografska kolona je cijev koja sadrži stacionarnu fazu kroz koju prolazi mobilna faza s uzorkom. Uslijed različite raspodjele komponenata uzorka između stacionarne i mobilne faze dolazi do razdvajanja tih komponenti na koloni. Tijelo takve jedne kolone najčešće je građeno od metalne (nehrđajući čelik) ili plastične (npr. PEEK) cijevi ispunjene stacionarnom fazom koja se razlikuje s obzirom na sastav i veličinu pora. Osnovni dio svakog punila je silikagel, a ovisno o prirodi ispitivanih spojeva (kiseli, bazični, hidrofilni, hidrofobni) silanolne grupe (Si-OH) derivatiziraju se odgovarajućim spojevima. Polifenoli se kvantificiraju uz pomoć C8 kolona (oktil skupina, C_8H_{17}-) ili C18 kolona (oktildecil skupina, $C_{18}H_{37}$-), dakle silikagelom obloženim lipofilnim lancima. Takve su kolone dio kromatografije obrnutih faza kod kojih je stacionarna faza hidrofobna, a mobilnu čini smjesa polarnih otapala (voda, metanol, acetonitril). Uobičajen unutarnji promjer analitičkih kolona je između 4 i 10 mm, a duljina između 10 i 30 cm, iako su moguće i druge dimenzije. Moguće je uz kolonu koristiti i predkolonu čija je uloga zaštita kolone od mogućih onečišćenja (Skoog i sur., 1999).

Nakon prolaska kroz kolonu mobilna faza (s uzorkom) dolazi do detektora. Zbog raznovrsne primjene tekućinske kromatografije primjenjuju se različiti detektori, čiji je pravilan izbor vrlo važan korak u HPLC analizi.

Specifična svojstva pojedinih detektora za sobom nužno povlače i neke restrikcije prilikom njihova odabira za pojedine vrste uzoraka za analizu. U istoj analizi može se koristiti više od jedan detektor. Kada se koristi više detektora, u pravilu se spajaju u seriju, iako je moguće i paralelno povezivanje. Prilikom odabira detektora za bilo koju vrstu analize najvažnije je poznavati cilj analize i sukladno tome odabrati odgovarajući detektor (Moldoveanu i David, 2012). Svi detektori dizajnirani su tako da omoguće kvalitativna mjerenja, ali nisu svi u mogućnosti provesti kvantitativnu analizu. Stoga kada je potrebna samo kvantitativna analiza i poznata je priroda analita, pik za poznati spoj može se identificirati samo na temelju retencijskog vremena. Odabir specifičnog detektora za kvantifikaciju ovisi o potrebnoj preciznosti i točnosti, prirodi analita, razini analita u uzorku i metodama koje se koriste za pripremu uzorka. Ovisno o svrsi analize, odabir detektora ili postavke detektora moraju se izvršiti tako da ostvare potrebe analize i da se postignu tražene granice kvantifikacije (LOQ).

Ima više vrsta detektora, a to su: UV-VIS, fluorescentni detektor, detektor indeksa loma, maseni spektrometar detektor i detektor električne vodljivosti. Prema IOOC (*International olive council*) HPLC-UV metoda definirana je kao standardna metodu za kvantifikaciju biofenola u maslinovu ulju. U razvijenim metodama koriste se različiti detektori poput UV-VIS DAD

(detektor s nizom dioda, engl. *Diode-Array Detector*), ECD (elektrokemijski detektor, engl. *electrochemical detection*) i MS (maseni detektor, engl. *mass spectrometry detector*). U praksi DAD i MS najčešće su korišteni detektori (Bayram i sur., 2012). Prilikom izrade ovog diplomskog rada korištena je metoda HPLC-DAD. U ovoj metodi poslije izlaska iz kolone, uzorku se mjeri apsorbancija, *A*, u vidljivom (350 – 850 nm), odnosno ultraljubičastom (200 – 350 nm) spektralnom području. DAD detektor omogućuje praćenje apsorpcije elektromagnetskog zračenja na svim valnim duljinama istovremeno.

1.2.2. Kvantitativna HPLC analiza

Tri najčešće metode pomoću kojih se provodi kvantitativna HPLC analiza:

Metoda sa standardom

Kod metoda sa standardom mjeri se ili visina ili površina pika. Visina pika jest duljina okomice povučene iz njegova vrha do njegove baze. Na nju utječu brojni čimbenici, poput brzine protoka, temperature te brzine injektiranja samog uzorka. Zato je uobičajenije mjeriti površinu, na koju ni jedan od navedenih čimbenika ne utječe. Koji god se parametar određivao, visina ili površina pika ispitivane otopine uspoređuje se s pikom standardne otopine. Koncentracija spoja u uzorku izračuna se po formuli:

$$A_{io} / A_{so} = c_{io} / c_{so}$$

A_{io} –površina ispod pika ispitivane otopine

A_{so} – površina ispod pika standardne otopine

c_{io} – koncentracija ispitivane otopine

c_{so} – koncentracija standardne otopine

Standardna otopina je otopina analita poznate koncentracije.

Metoda baždarnog pravca

Metoda baždarnog pravca uključuje prikaz ovisnosti promjene veličine koju mjerimo (apsorbancija) o koncentraciji analita. Prvo se izrade otopine standarda poznatih koncentracija (najčešće se pripremaju u koncentracijama koje rastu poput aritmetičkog niza) kojima se mjeri određeno svojstvo (u ovom slučaju apsorbancija). Posljednji je korak izrada baždarnog pravca,

pomoću kojeg se uzorcima nepoznate koncentracije na temelju izmjerene apsorbancije određuje koncentracija. Metoda je brza, jednostavna, ali nekad može biti nepouzdana zbog oscilacija volumena pri injektiranju volumena standardnih otopina u kolonu. Volumeni su mikrolitarski i može se dobiti pogreška i do nekoliko %. Drugi su problem ove metode vrijednosti koje su iznad ili ispod vrijednosti najveće ili najmanje standardne otopine u nizu. Za takve koncentracije ne smije se samo ekstrapolirati baždarni pravac već i razrjeđivati uzorak i naknadno množiti s faktorom razrjeđenja.

Metoda unutarnjeg standarda

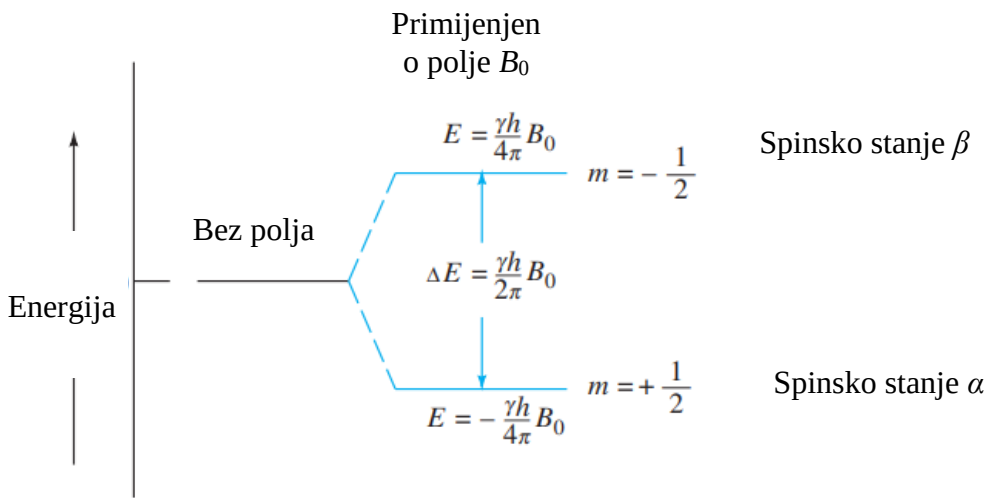
Metoda unutarnjeg standarda postiže najveću preciznost koja se gubi, na primjer, kod metode standardnih otopina gdje se vrlo lako mogu razlikovati volumeni uzoraka standardne i otopine za ispitivanje. U obje otopine doda se pažljivo izvagan unutrašnji standard, najčešće spoj strukturno sličan ispitivanom. Analitički parametar omjer je površine/visine pika ispitivanog analita i unutarnjeg standarda. Da bi metoda bila valjana, pik unutarnjeg standarda mora biti odijeljen s razlučivanjem $Rs > 1{,}25$ (kvantitativna mjera odjeljivanja kromatografskih krivulja dviju komponenata) od ostalih sastavnica te biti u blizini analita. Preciznost ove metode, ako je unutarnji standard pogodan, može biti 0,5 – 1 % (Skoog i sur., 1999).

1.3. Princip NMR spektroskopije

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) temelji se na mjerenju rezonantne apsorpcije elektromagnetskog zračenja frekvencije 50 – 800 MHz (radiovalno područje) atomske jezgre u vanjskom magnetskom polju. NMR temelji se na svojstvu (atomskih jezgara) koje nazivamo spin. Prikazujemo ga spinskim kvantnim brojem I, a ovisi o broju protona i neutrona jezgre. Jezgra koja ima spinski kvantni broj I može u prostoru zauzeti $2I + 1$ različitih orijentacija magnetskog momenta molekule, odnosno toliko različitih spinskih stanja. Spin ne posjeduju samo jezgre parnog broja protona i neutrona (I mora biti veći od nule), pa ih ne možemo koristiti za analizu u NMR spektroskopiji (npr. ^{12}C). Primjeri jezgri koje se najčešće koriste u NMR analizi su: ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P. Spinski kvantni broj za ove jezgre je $I = 1/2$. Dakle, svaka jezgra ima dva spinska stanja koja odgovaraju $I = +½$ ili $I = –½$. U slučaju ^{1}H NMR, on određuje vrstu i broj vodikovih atoma, dok ^{13}C NMR određuje vrstu i broj atoma ugljika u molekuli. Magnetski moment jezgre vektor je koji pokazuje iznos i smjer „magneta“ jezgre.

Prema Heisenbergovu principu neodređenosti, za poznati iznos momenta ne mogu se točno znati njegove koordinate, pa vektor prikazujemo kako leži negdje na stošcu.

U odsutnosti vanjskog magnetskog polja jezgre su nemagnetizirane, pa različita spinska stanja imaju jednake energije, a sve su orijentacije magnetskog momenta jednako vjerojatne (jezgre se u prostoru nalaze proizvoljno orijentirane) (Skoog i sur., 2016.).



Slika 5. Energetski dijagram koji prikazuje energetske razine spinskih stanja jezgre čiji je I = 1/2. Prilagođeno iz Skoog i sur., 2016.

Kao što je prikazano na Slici 6., kada se jezgra sa spinskim kvantnim brojem 1/2 (npr. ^{1}H jezgra) nalazi u vanjskom magnetskom polju B_0, njezin magnetski moment postaje orijentiran u jednom od dvaju smjerova u odnosu na polje, u smjeru ili suprotno od smjera primijenjenog magnetskog polja. Energija jezgre u ovim dvjema orijentacijama dana je izrazom:

$$E = -\frac{\gamma m h}{2\pi} B_0$$

E = energija jezgre određenog spinskog stanja
γ = žiromagnetski omjer
m = nuklearni magnetski spinski kvantni broj
h = Planckova konstanta
B_0 = jakost vanjskog magnetskog polja

Većina jezgara orijentirana je u smjeru magnetskog polja (spinsko stanje α) čija je energija niža od energije spinskih stanja jezgara čiji je magnetski moment orijentiran suprotno od smjera

vanjskog polja (spinsko stanje β). Potencijalna energija za ova dva spinska stanja računa se prema formulama:

$$E_{+1/2} = -\frac{\gamma h}{4\pi} B_0 \qquad E_{-1/2} = \frac{\gamma h}{4\pi} B_0$$

Razlika u energijama dvaju spinskih stanja:

$$\Delta E = \frac{\gamma h}{4\pi} B_0 - \left(-\frac{\gamma h}{4\pi} B_0\right) = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0$$

Do prijelaza između energijskih stanja dolazi uslijed rezonantne apsorpcije zračenja frekvencije ν_0 koja po energiji odgovara ΔE (Skoog i sur., 2016):

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Taj prijelaz iz spinskog stanja niže u stanje više energije naziva se rezonantnom apsorpcijom zračenja, a ona se događa samo ako je frekvencija elektromagnetskog zračenja jednaka tzv. Larmorovoj frekvenciji – frekvenciji prijelaza između spinskih stanja (Atkins 2006). Energija koja je potrebna da izazove rezonanciju određene skupine atoma mjeri se relativno prema energiji potrebnoj za rezonancijsku apsorpciju standarda, tetrametilsilana (TMS). TMS je standard koji se dodaje u uzorak prije snimanja spektra, a koristi se kao standard jer daje jedan oštar apsorpcijski signal (i u ^{1}H i ^{13}C spektrima NMR-a) kod jačeg magnetskog polja od većine poznatih molekula. Koristi se da bi se označio položaj apsorpcije protona ili ugljika u uzorku. Relativni položaj apsorpcije u NMR spektru (u odnosu na unutarnji standard TMS) naziva se kemijski pomak, a intenzitet apsorpcije izravno je proporcionalan broju protona u ^{1}H NMR spektru. Desno od TMS (kojem se pripisuje 0 ppm) su negativne (–), a lijevo pozitivne (+) vrijednosti kemijskih pomaka. Kemijski pomak izražava se u jedinicama ppm, a dobije se dijeljenjem razlike rezonantnih frekvencija određene jezgre (ν) i referentne supstancije ($\nu_{ref.}$) s frekvencijom spektrometra:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_1} \; 10^{-6}$$

$\boldsymbol{\delta}$ = kemijski pomak

$\boldsymbol{\nu}$ = frekvencija promatrane jezgre

$\boldsymbol{\nu_{ref}}$ = frekvencija referentne supstance

$\boldsymbol{\nu_1}$ = frekvencija spektrometra

Kemijski pomak ovisi o konstanti zasjenjenja koja je karakteristična za kemijsku okolinu svake jezgre. On je posljedica činjenice da na sve atome u molekuli ne djeluje jednako magnetsko polje, već postoje različita magnetska polja koja djeluju na pojedini atom. Jezgre atoma zapravo nisu podvrgnute magnetskom polju koje se primjenjuje u eksperimentu, već nekom individualnom magnetskom polju, koje nastaje kao rezultat superpozicije primijenjenog magnetskog polja i lokalnog magnetskog polja. Lokalno magnetsko polje posljedica je kružne struje elektrona u vanjskom magnetskom polju, a ta struja stvara dodatan doprinos ukupnom magnetskom polju koje djeluje na jezgru. Lokalno polje elektrona uvijek je suprotnog smjera od onog vanjskog, pa će efektivno magnetsko polje koje djeluje na jezgru uvijek biti manje od onog primijenjenog. Efektivan iznos magnetskog polja koje djeluje na jezgru ovisi o elektronskoj strukturi u neposrednoj okolini jezgre, a tu elektronsku okolinu oko jezgre opisujemo konstantom zasjenjenja. Ona sadrži doprinose zasjenjenju od elektrona oko jezgre, ali i doprinose susjednih funkcionalnih skupina te molekula otapala. Jezgre oko kojih se nalazi mnogo elektrona i elektron-donorskih funkcionalnih skupina bit će jako zasjenjene. Inducirano magnetsko polje znatno će smanjiti iznos primijenjenog vanjskog polja, što rezultira relativno slabim efektivnim magnetskim poljem, stoga je kemijski pomak osjetljiv na konfiguracijska i konformacijska obilježja molekule. Kemijski pomaci često su specifični za pojedine skupine ili fragmente u određenom kemijskom okruženju. Veća lokalna gustoća elektrona rezultirat će jačim zasjenjenjem. Posljedično jezgra slabije osjeća utjecaj vanjskog magnetnog polja, pa ima viši kemijski pomak. Skupine ili atomi s visokom elektronegativnošću smanjuju elektronsku gustoću oko promatrane jezgre. Takva je jezgra slabijeg zasjenjenja i ima niži kemijski pomak.

Kemijski pomak jezgre sastoji se od nekoliko međusobno povezanih doprinosa: dijamagnetnih i paramagnetnih doprinosa te od anizotropije susjednih atoma.

Dijamagnetni doprinos povezan je sa σ-elektronima. Signali su pomaknuti prema višim magnetskim poljima, tj. manjim kemijskim pomacima.

Paramagnetni doprinos rezultat je djelovanja π-elektrona. Signali su pomaknuti prema nižim poljima, tj. većim kemijskim pomacima.

Anizotropni efekti za ^{13}C jezgru nisu jako izraženi jer iznose oko 2 ppm na raspon kemijskih pomaka od 300 ppm (kod ^{1}H su ti isti efekti u raspon od 10 ppm).

Spektralni parametar NMR-a uz kemijski pomak je i konstanta sprezanja spin-spin (*J*). Sprezanje spin-spin između istovrsnih jezgara (npr. 1H1H) homonokluearna je sprega, dok je sprega između raznovrsnih jezgara (npr. 1H13C) heteronuklearna sprega. NMR signal promatrane jezgre zbog sprezanja sa susjednom jezgrom cijepa se u multiplet prema pravilu $2nI + 1$, pri čemu je n broj susjednih jezgara, a I spinski kvantni broj jezgre. Prema multipletnosti signali mogu biti singlet, dublet, triplet, kvartet, kvintet itd. Signali u 1H NMR spektru cijepaju se prema pravilu $2nI + 1$ u $n + 1$ pikova, gdje je n broj ekvivalentnih protona vezanih uz susjedni ugljik, a $I = 1/2$. Broj pikova u signalu zove se multiplet signala. Međusobno se cijepaju spregnuti protoni, a cijepanje signala uzrokovano je spin-spin spregom i javlja se kada su različiti protoni jedan blizu drugoga (Friebolin, 1998.).

1.3.1. NMR spektrometar

Osnovni su dijelovi NMR spektrometra izvor odgovarajućeg elektromagnetskog zračenja (radiofrekvencije) i magnet koji može proizvesti jednolično magnetsko polje. U jednostavnim instrumentima magnetsko polje osigurava trajni magnet. Kod složenijih uređaja koristi se supravodljivi magnet koji može proizvoditi magnetsko polje i do 10 *T*. U nekim slučajevima uzorak se brzo rotira kako bi se uklonile magnetske nehomogenosti, međutim rotiranje uzorka može dovesti do nereproducibilnih rezultata i često se izbjegava. Supravodljivi magnet mora biti na temperaturi tekućeg helija (– 269,15 °C ili 4 K). Uzorak se uobičajeno analizira na sobnoj temperaturi (Atkins 2006). Moderni NMR uređaji temelje se na pulsnoj tehnici pobuđivanja. Ispitivanom uzorku smještenom u magnetskom polju konstantne jakosti dovodi se puls ili niz vrlo kratkih i kontroliranih pulseva elektromagnetskog zračenja radiovalnog područja promjenjive frekvencije, što u konačnici dovodi do reorijentacije spinskih stanja atomskih jezgara. Pomoću postavljenog radiofrekvencijskog odašiljača stimulira se prijelaz između dvaju spinskih stanja, što bilježi radiofrekvencijski prijemnik u obliku rezonantnog

signala NMR. Na kraju analize dobiva se spektar koji se temelji na Fourierovoj transformaciji, koja funkciju intenziteta signala o vremenu pretvara u spektar koji prikazuje ovisnost intenziteta signala o frekvenciji (Watson, 1999; Carbajo i Neira, 2013). Spektar zadovoljavajućeg odnosa intenziteta signala u odnosu na šum dobije se superpozicijom većeg broja mjerenja.

Osim identifikacije, analizom NMR spektara dobivaju se vrijedne informacije o strukturi, dinamici te kemijskom okolišu molekule. Spektroskopiju NMR najčešće koriste kemičari i biokemičari pri istraživanju svojstava organskih molekula. ^{1}H NMR spektroskopija (koja je korištena prilikom izrade ovog diplomskog rada) najčešće je korištena NMR metoda upravo zbog svoje mogućnosti identifikacije i jednoznačnog utvrđivanja trodimenzionalne molekulske strukture različitih spojeva. Površine signala u ^{1}H NMR spektru proporcionalna je broju ekvivalentnih protona, stoga se navedena metoda može koristiti i za kvantitativne i za kvalitativne analize. Kako je riječ o vrlo robusnoj metodi koja pruža mogućnost kvantitativne analize složenih smjesa u jako kratkom vremenu, ^{1}H NMR spektroskopija prepoznata je kao jedna od metoda za analizu sadržaja maslinovih ulja. Opće je prihvaćena upotreba ^{1}H NMR spektroskopije u svrhu kvantitativne analize polarne, manjinske frakcije maslinovih ulja, određivanje sadržaja flavonoida, sekoiridoida, lignana te fenolnih kiselina i alkohola. Prednost ove metode očituje se u tome što prethodna derivatizacija spojeva, kao i upotreba standarda, nisu potrebne (Olmo-Cunillera i sur., 2020).

2) OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje već je dugo prepoznato kao vrijedan izvor biološki aktivnih spojeva, među kojima u posljednje vrijeme iznimnu pozornost privlače oleokantal i oleacein (Francisco i sur., 2019; Lozano-Castellón i sur., 2019). Osim ovih spojeva utvrđen je značajan biološki učinak i niza drugih fenolnih spojeva, kao što su hidroksitirozol, tirozol, pinorezinol, cimetna kiselina i apigenin (Olmo-Cunillera i sur., 2020).

Ovaj diplomski rad dio je šireg istraživanja, koje je usmjereno na ispitivanje povezanosti sadržaja navedenih fenolnih spojeva i biološkog učinka maslinova ulja na stanice melanoma.

U ovu svrhu potrebno je pripremiti fenolne ekstrakte maslinova ulja, odrediti sadržaj određenih fenolnih spojeva u ekstraktima, što će se u konačnici nastojati povezati s učinkom na odgovarajuće stanične kulture. Odabrano je šest maslinovih ulja različitih sorti za koje se pretpostavilo da bi se mogle razlikovati prema sadržaju navedenih fenolnih spojeva.

Sadržaj oleokantala i oleaceina određuje se u ekstraktima koji su pripremljeni s acetonitrilom i cikloheksanom uz primjenu NMR spektroskopije, dok se sadržaj ostalih navedenih spojeva određuje u ekstraktima koji su pripremljeni s metanolom i heksanom uz primjenu HPLC-DAD spektroskopije.

Cilj je ovog diplomskog rada utvrditi dobije li se uz oba ekstrakcijska postupka jednak sadržaj svih ispitanih spojeva, kako bi se mogao odabrati jedan ekstrakcijski postupak prema kojem će se pripremiti uzorci za daljnja biološka ispitivanja, a dobiveni rezultati bioloških pokusa moći će se povezivati sa sadržajem svih navedenih fenolnih spojeva.

3) MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci maslinova ulja

Ispitan je sastav šest maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline: Rosulja (Oleum Viride), Buža (Brist), Bjelica (Brist i Oleum Viride), Vodnjanska crnica (Oleum Viride) i Višesortno ulje Istra. Svim je uljima godina berbe 2020. Tijekom skladištenja uzorci su čuvani u tamnim bocama pri temperaturi od 4 °C.

3.1.2. Kemikalije

- acetonitril, Reag. Ph. Eur, za tekućinsku kromatografiju (LiChrosolv®, Merck, Njemačka)
- cikloheksan (Emplura®, Merck, Njemačka)
- metanol za HPLC (Sigma-Aldrich, Stockholm, Švedska)
- n-heksan ≥ 99 % (Honeywell Burdick & Jackson, Njemačka)
- octena kiselina (ledena) 100 % (Merck, Njemačka)
- siringaldehid (Sigma-Aldrich, SAD)
- hidroksitirozol, apigenin i pinorezinol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Njemačka)
- galna kiselina, tirozol i cimetna kiselina (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska)
- redestilirana filtrirana voda za HPLC (pripremljena na Zavodu za fizikalnu kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu).

3.1.3. Instrumenti

- HPLC DAD Series 200 system with diode array detector (DAD) (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD)
- ^{1}H NMR (Bruker Avance 600 (14,1 T) (Institut Ruđer Bošković, Centar za NMR)
- laboratorijski rotacioni uparivač (R-200, Büchi, Švicarska)
- vortex električna miješalica (Mixer, Thermolyne Corporation, SAD)

- analitička vaga (HX-3000, Lenz, Japan)
- ultrazvučna kupelj (Elma Transsonic T570 HF=320 W, Njemačka)
- centrifuga (Phoenix Instrument, Garbsen, Njemačka).

3.1.4. Pribor

- Eppendorfove automatske pipete: 0,5 – 10 µL; 10 – 100 µL; 20 – 200 µL; 100 – 1000 µL s odgovarajućim plastičnim nastavcima za jednokratnu upotrebu
- staklene odmjerne tikvice od 100 i 250 mL s čepom
- staklene čaše od 100 mL
- staklene Erlenmayerove tikvice s ubrušenim čepom
- Eppendorfove tube
- plastična tuba za centrifugiranje
- plastična šprica
- politetrafluoretilenski filter (PTFE) za HPLC (0,20 µm/13mm) (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany).

3.1.5. Programski paketi

- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- TopSpin 4.0.7., Bruker.

3.2. Metode

Određivanje polifenola u maslinovu ulju provedeno je primjenom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Analiti su iz uzorka ekstrahirani primjenom dvaju metoda ekstrakcije: ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija tekuće-tekuće potpomognuta ultrazvukom. Nakon provedenih analiza uspoređene su obje metode ekstrakcije i određivanja polifenola u svrhu pronalaženja optimalne analitičke metode.

3.2.1. Ekstrakcija

Provedene su i uspoređene dvije metode ekstrakcije polifenolnih spojeva.

3.2.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće potpomognuta ultrazvukom (za potrebe HPLC analize)

Ova metoda ekstrakcije primijenjena je za sve uzorke koji su se analizirali HPLC metodom. Priprema ekstrakta polifenolnih spojeva maslinovih ulja provedena je prema proceduri opisanoj u radovima (Jerman i sur., 2012; Torić i sur., 2020b) uz određene prilagodbe. Za potrebe ekstrakcije izvaže se uzorak maslinova ulja (20,00 ± 0,01 g) u okruglu tikvicu koja je prekrivena aluminijskom folijom jer na stabilnost polifenola utječe svjetlost. Izvagani uzorak pomiješa se prvo sa 10 mL n-heksana te se potom doda 15 mL metanola. Pomoću ultrazvučne kupelji ekstrakcija se provodi tijekom 10 min. Temperatura ultrazvučne kupelji je do 30 °C jer su polifenoli jako osjetljivi na toplinu. Sadržaj tikvice je potom centrifugiran na 4000 rpm tijekom 7 min uslijed čega su se odvojili sloj n-heksana i metanolni sloj s polifenolima. Metanolni (gornji) sloj kvantitativno se prenese u Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL obloženu aluminijskom folijom. U ostatak (cijeli n-heksanski sloj i zaostali metanolni sloj) ponovo se doda 15 mL metanola te se cjelokupni postupak s ultrazvučnom kupelji, centrifugom i odvajanjem slojeva ponovi još dvaput. Metanolni slojevi prikupljeni u Erlenmeyerovu tikvicu prebace se u stakleni lijevak za odjeljivanje te se izmućkaju dvaput s 90 mL n-heksana. Prilikom odjeljivanja u čistu okruglu tikvicu odvoji se donji (metanolni sloj) i upari za daljnju analizu. Sadržaj tikvice ispari se do suha na vakuum isparivaču (najviše do 38 °C tijekom 10 min). Tako pripremljen suhi ekstrakt može se odmah analizirati ili pohraniti u frižider za kasniju analizu. Dobiven sirovi ekstrakt u obliku zelenkaste smole može se odmah analizirati ili pohraniti u frižider. Za HPLC analizu suhi ekstrakt ulja otopi se u 1700 µL metanola. Otopina se pomoću plastične šprice profiltrira kroz politetrafluoretilenski filter (PTFE) (0,20µm/13mm) u Eppendorfovu tubu. Uzorak za HPLC analizu pripremi se tako da se 800 µL te otopine iz Eppendorfove tube otpipetira u HPLC vialu.

3.2.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (za potrebe NMR analize)

Ova metoda ekstrakcije primijenjena je za sve uzorke koji su analizirani NMR metodom. Polifenolni spojevi iz maslinova ulja ekstrahirani su prema literaturi (Kugić, 2020.; Karkoula i sur., 2014.) uz određene prilagodbe. Za potrebe ekstrakcije u okruglu tikvicu (od 100 ili 250 mL) obloženu aluminijskom folijom izvaže se (5,00 ± 0,01) g uzorka maslinova ulja. U tikvicu

se potom doda 25 mL acetonitrila i 20 mL cikloheksana. Smjesa ulja i ekstrakcijskih otapala miješa se dvije min uz pomoć vortex električne miješalice, pri čemu dolazi do ekstrakcije fenolnih spojeva u acetonitrilni sloj. Nakon toga, smjesa se centrifugira u plastičnoj tubi za centrifugiranje 5 min uz 4000 rpm. Odvoji se acetonitrilna frakcija (gornji sloj) te joj se doda 1,0 mL acetonitrilne otopine siringaldehida koncentracije 0,5 mg/mL (interni standard). Acetonitrilna frakcija zatim se ispari do suha s vakuumskim isparivačem pri temperaturi ne višoj od 33 °C. Tijekom cijelog postupka, uzorak se minimalno izlagao svjetlosti i kisiku. Do NMR analize suhi ostatak čuvan je u zamrzivaču na temperaturi od – 8 °C. Suhi ostatci dobiveni ekstrakcijom otopljeni su u 750 µL deuteriranog kloroforma, a od toga je 550 µL zatim preneseno u 5 mm NMR tubu za snimanje NMR spektra.

3.2.2. Priprema otopina standarda za HPLC analizu

Pripremljene su otopine standarda tirozola, homovanilina, *o*-kumarinske, *p*-kumarinske i cimetne kiseline koncentracije 0,1 mol/dm^3. Krutine navedenih standarda odvagane su u Eppendorfove tube (Tablica 2.) te im je dodan 1 mL metanola. Kromatogram (Slika 6.) tako pripremljenih otopina standarda uspoređen je s kromatogramom standarda već ranije napravljenim na istom instrumentu. Za analizu HPLC kromatograma fenolnih ekstrakata maslinova ulja napravljenih u ovom diplomskom radu korištena su Rt (Tablica 3.) i jednadžbe pravaca standarda (Tablica 4.) objavljenih u literaturi Torić i sur., 2020b.

Tablica 2. Odvage pripremljenih otopina standarda za tirozol, homovanilin, *o*-kumarinsku kiselinu, *p*-kumarinsku kiselinu i cimetnu kiselinu.

Standard	Masa odvage (g)
tirozol	0,0139
homovanilin	0,0164
o-kumarinska kiselina	0,0168
p-kumarinska kiselina	0,0165
cimetna kiselina	0,0149

0,001 mol/dm^3 otopine standarada pripremljene su u Eppendorfovim tubama razrjeđivanjem 0,1 mol/dm^3 otopina. U Eppendorfovu tubu pipetirano je 10µL 0,1 mol/dm^3 otopine standarda i 990µL metanola. Potom je pripremljena konačna smjesa pet standarda i galne kiseline. U HPLC vialu pipetirano je 80µL svake 0,001 mol/dm^3 otopine standarda. U istu HPLC vialu otpipetirano je još 400µL metanola i 4µL 0,01 mol/dm^3 otopine galne kiseline. Konačna je koncentracija pojedinog standarda 0,0001 mol/dm^3.

Priprema galne kiseline

Otopina galne kiseline koncentracije 0,1 mol/dm^3 u metanolu priređena je u odmjernoj tikvici od 10 mL. U tikvicu je izvagano 0,1697 g galne kiseline i nadopunjeno do oznake metanolom. Otopina galne kiseline koncentracije 0,01 mol/dm^3 priređena je u Eppendorfovoj tubi. U Eppendorfovu tubu pomiješano je 10 µL 0,1 mol/dm^3 galne kiseline i 90 µL metanola te se u svaki uzorak maslinova ulja u HPLC vialu otpipetiralo 4 µL ovako pripremljenog standarda.

Priprema mobilne faze

50 %-tni metanol pripremljen je tako da su pomiješani jednaki volumeni metanola i redestilirane filtrirane vode. 2 %-tna octena kiselina pripremljena je u odmjernoj tikvici od 500 mL razrjeđivanjem ledene octene kiseline (10 mL) s redestiliranom filtriranom vodom.

3.2.3. Identifikacija polifenola i određivanje koncentracije HPLC analizom

Odvajanje polifenolnih komponenata maslinova ulja postiže se gradijentnom metodom prema zadanim uvjetima procedure (Jakobušić Brala i sur., 2015) na HPLC uređaju Perkin Elmer Series 200 (SAD) s detektorskim nizom dioda (DAD). Korištena je kolona C18 Restek (5 µm, 250 × 4,0 mm) na temperaturi od 25 °C. Volumen injektiranog uzorka je 25 µL. Protok mobilne faze je 1 mL/min , a ukupno trajanje analize 45 min. Sasatav mobilne faze mijenjao se tijekom analize, tako što su se u različitim omjerima miješala 2 otapala: 2%-tna octena kiselina i metanol.

Gradijent mobilne faze:

1) 95 % octena kiselina – 5 % metanol → 2 min
2) 75 % octena kiselina – 25 % metanol → 8 min
3) 60 % octena kiselina – 40 % metanol → 10 min

4) 50 % octena kiselina – 50 % metanol → 10 min

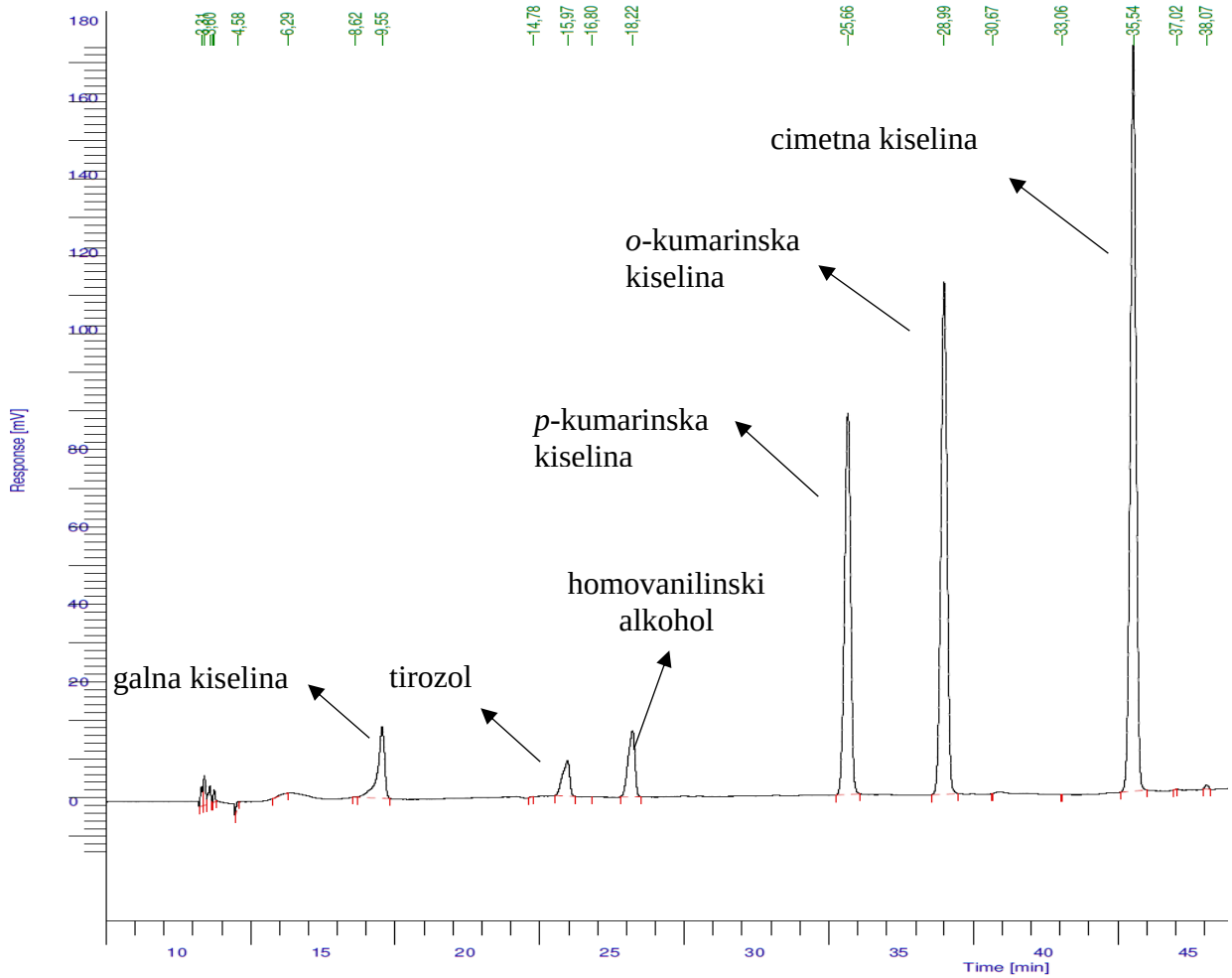
5) 0 % octena kiselina – 100 % metanol → do kraja analiza.

Apsorbancija eluiranih polifenolnih komponenti mjerena je na 278 nm. Retencijska vremena (Rt) fenolnih spojeva uspoređena su s retencijskim vremenima standarda (Tablica 3. Retencijska vremena standarda fenolnih spojeva (Torić i sur, 2020b)). HPLC kromatogram i pripadajuća retencijska vremena otopina standarda prikazana su na Slika 6. HPLC kromatogram standardnih otopina galne kiseline, tirozola, homovanilina, p-kumarinske kiseline, *o-kumarinske* kiseline i cimetne kiselineFenolne komponente kvantificirane su integracijom površine dobivenih pikova uz pomoć odgovarajućih baždarnih pravaca. Uz upotrebu baždarnih pravaca (Tablica 4.) izračunata je koncentracija pojedinog spoja u mg/mL ekstrakta Konačne koncentracije fenolnih spojeva izražene su u mg polifenola/kg uzorka maslinova ulja i izračunate su prema formuli:

$$c \text{ (polifenola) (mg/kg ulja)} = \frac{c\ (polifenola)\ (mg\ po\ mL\ ekstrakta) * volumen\ otapala\ (mL)}{masa\ uzorka\ koja\ se\ koristila\ za\ ekstrakciju\ (g)} * 1000$$

Tablica 3. Retencijska vremena standarda fenolnih spojeva (Torić i sur, 2020b)

Standard	Rt (min)
galna kiselina	9,66
hidroksitirozol	12,02
tirozol	15,66
homovanilin	18,13
p-kumarinska kiselina	25,43
o-kumarinska kiselina	29,81
pinorezinol	33,41
cimetna kiselina	35,31
apigenin	42,65



Slika 6. HPLC kromatogram standardnih otopina galne kiseline, tirozola, homovanilina, p-kumarinske kiseline, *o*-kumarinske kiseline i cimetne kiseline

Tablica 4. Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje sadržaja tirozola, hidroksitirozola, apigenina, pinorezinola i cimetne kiseline u uzorcima maslinova ulja (Torić i sur., 2020a)

Fenolni spoj	Rt/min	Jednadžba pravca
Tirozol	15,66	$y = 1405 * 10^4 x – 1682 * 10^2$ $R^2 = 0,9989$
Hidroksitirozol	12,02	$y = 2145 * 10^4 x – 5961 * 10^2$ $R^2 = 0,9927$
Apigenin	42,65	$y = 6090 * 10^4 x – 3867 * 10^1$ $R^2 = 0,9999$
Pinorezinol	33,41	$y = 2289 * 10^4 x – 6791$ $R^2 = 1,000$
Cimetna kiselina	35,31	$y = 1678 * 10^5 x – 4036 * 10^1$ $R^2 = 0,9980$

* x – koncentracija (mg/mL) fenolnog spoja u ispitivanom uzorku
* y – površina pripadajućeg pika na dobivenom kromatogramu uzorka

3.2.4. Priprema otopina standarda za NMR analizu

Priprema otopine siringaldehida

Acetonitrilna otopina internog standardna (IS) siringaldehida koncentracije 0,5 mg/mL priređena je u odmjernoj tikvici od 50 mL. U tikvicu je izvagano 0,0255 g siringaldehida (4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid) i nadopunjeno do oznake acetonitrilom. Stabilnost otopine kontrolirana je UV-Vis spektrofotometrijski. Otopina je čuvana u zamrzivaču pri temperaturi od – 8 °C . Uzorak se minimalno izlagao svjetlosti i kisiku. Izbor siringaldehida kao internog standarda temeljio se na sljedećim razlozima (Karkoula i sur., 2012):

- ni jedan od proučavanih ekstrakata maslinova ulja nije sadržavao siringaldehid ili bilo koji drugi pik koji se preklapa s aldehidnim protonom siringaldehida
- jeftin je, stabilan i lako pristupačan spoj, dobro topiv u CDCl3
- ^{1}H NMR spektar siringaldehida vrlo je jednostavan, sastoji se od samo triju singleta, što minimizira mogućnost preklapanja s drugim područjima spektra.

3.2.5. Identifikacija polifenola i određivanje koncentracije NMR analizom

^{1}H NMR spektri snimljeni su na Institutu Ruđer Bošković, u Centru za NMR. Spektri su snimljeni pri frekvenciji od 600,130 MHz, pri temperaturi od 25 °C. Za snimanje ^{1}H NMR spektara korištena je spektralna širina 0 – 20 ppm (12 000 Hz), s prikupljanjem 32 800 podataka i vremenom akvizicije od 1,36 s. Digitalno razlučivanje iznosi 0,7 Hz po točki. Korišteno je relaksacijsko vrijeme odgode od 5,0 sa 64 pulsa po spektru i pulsni kut 90°. Dobiveni ^{1}H NMR spektri koriste se za kvantitativno određivanje oleokantala i oleaceina. Spektri su obrađeni uz primjenu TopSpin programa, uz ručno integriranje odgovarajućih signala. ^{1}H NMR spektri fenolnih ekstrakata maslinova ulja u deuteriranom kloroformu između 9,10 i 9,83 ppm prikazuju niz signala koji odgovaraju aldehidnim protonima analiziranih sekoiridoidnih fenolnih spojeva. Ručno su integrirani dubleti aldehidnih protona oleaceina na 9,21 ppm i oleokantala na 9,23 ppm kao i singlet aldehidnog protona siringaldehida na 9,82 ppm te je izračunan omjer dobivenih površina oleaceina i internog standardna ($P_{oleacein}/P_{IS}$) te oleokantala i internog standarda ($P_{oleokantal}/P_{IS}$). Navedeni spojevi identificirani su prema literaturi (Karkoula E. i sur. , 2014). Za kvantifikaciju oleaceina i oleokantala u uzorcima ekstrakata maslinova ulja preuzeti su baždarni pravci iz literature (Kugić, 2020).

Tablica 5. Baždarni pravci koji su se koristili za određivanje sadržaja oleokantala i oleaceina u uzorcima maslinova ulja (Kugić, 2020.)

Fenolni spoj	Baždarni pravac
Oleokantal	$y = 0{,}00416x - 0{,}006$ $R^2 = 0{,}9964$
Oleacein	$y = 0{,}0024x + 0{,}004$ $R^2 = 0{,}9966$

* y = omjer površina signala oleokantala/oleaceina i internog standarda umanjena za sadržaj oleokantala/oleaceina prisutnog u ulju
* x = koncentracija oleokantala/oleaceina u mg/kg maslinova ulja

4) REZULTATI I RASPRAVA

4.1. HPLC analiza fenolnih ekstrakata

Ispitan je sastav pet maslinovih ulja: Rosulja (Oleum Viride), Buža (Brist), Bjelica (Brist), Višesortno ulje Istra i Vodnjanska crnica (Oleum Viride). Prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1. pripremljeni su fenolni ekstrakti, čiji je sastav analiziran uz primjenu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD). Određen je sadržaj fenolinih spojeva: hidroksitirozol, tirozol, pinorezinol, cimetna kiselina i apigenin. Ovi su spojevi izabrani zbog svoje velike biomedicinske značajnosti (Karković Marković i sur., 2019). Fenolni spojevi identificirani su na temelju usporedbe retencijskih vremena pikova iz kromatograma ekstrakta maslinova ulja s retencijskim vremenima pikova iz kromatograma standardnih otopina. Pomoću baždarnih pravaca (Tablica 4.) izračunata je koncentracija pojedinog spoja u mg/mL ekstrakta, a zatim su te vrijednosti preračunate u koncentracije polifenolnih spojeva u uzorcima ulja i izraženi su u mg/kg ulja. Dobivene koncentracije fenolnih spjeva u ispitanim maslinovim uljima (Rosulja, Buža, Bjelica, Višesortno ulje Istra i Vodnjanska crnica) prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracija hidroksitirozola, tirozola, pinorezinola, cimetne kiseline i apigenina u maslinovim uljima (HPLC analiza)

Uzorak maslinova ulja (sorta)	OHTYR*		**TYR***		Pinorezinol		cimetna kiselina		apigenin	
	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)
Rosulja (Oleum Viride)	0,0213	1,81	0,0257	2,18	0,08870	7,45	0,0116	0,98	0,0190	1,61
Buža (Brist)	0,0165	1,40	0,0264	2,24	0,2165	18,40	0,0068	0,58	0,0222	1,88
Bjelica (Brist)	0,0280	2,38	0,0315	2,68	0,0884	7,51	0,0080	0,68	0,0505	4,30
Višesortno ulje Istra	0,0181	1,54	0,0294	2,50	0,0825	7,01	0,0121	1,03	0,0234	1,99
Vodnjanska crnica (Oleum Viride)	0,0331	1,16	0,0527	1,84	0,1690	5,92	0,0184	0,64	0,0723	2,53

*OHTYR = hidroksitirozol
*TYR = tirozol
*c_1 = koncentracija fenolnog spoja u otopini fenolnog ekstrakta (poglavlje 3.2.1.1. u kojem je opisano kako je otopina pripremljena) u mg/mL
*c_2 = koncentracija fenolnog spoja u uzorku maslinova ulja u mg/kg maslinova ulja
* crvena boja polja – izmjerene vrijednosti su ispod granice detekcije (LOD) i granice određivanja (LOQ)
* žuta boja polja – izmjerene vrijednosti su iznad LOD, ali ispod LOQ
* zelena boja polja – izmjerene vrijednosti su iznad LOD I LOQ

Iz prikazanih podataka vidljivo je da je koncentracija hidroksitirozola jako niska, da je ispod granice detektiranja (LOD), i to u svim ispitivanim uzorcima. Tirozola ima u malo većim koncentracijama, ali i dalje ispod granice određivanja (LOQ). LOD i LOQ računaju se iz standardnog odstupanja odsječka i nagiba baždarnog pravca prema formulama:

$$LOD = \frac{3{,}3 \times \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

σ = standardno odstupanje odsječka baždarnog pravca

a = nagib baždarnog pravca

Vrijednosti za LOD i LOQ korištene u ovome diplomskom radu preuzete su iz literature zajedno s baždarnim pravcima (Torić i sur., 2020b).

Ukupno gledano, koncentracije tirozola niže su negoli u literaturi, gdje su zabilježene koncentracije tirozola između 3 – 140 mg/kg , a hidroksitirozola u rasponu 1 – 12 mg/kg (Torić i sur., 2020b; Jakobušić Brala, 2015). Primijećeno je i da tirozola ima više od hidroksitirozola u svim analiziranim uzorcima. Ovako nizak sadržaj tirozola, koji je utvrđen u svim uzorcima, nije utvrđen u ranijim istraživanjima. Jedan je od razloga niskih koncentracija slobodnog hidroksitirozola i tirozola u ispitivanim uzorcima maslinova ulja taj što su prisutni u ulju u obliku svojih esterificiranih derivata. Hidroksitirool je uglavnom prisutan u obliku oleaceina (3,4-DHPEA-EDA) i monoaldehidnog oblika oleuropein aglikona (3,4-DHPEA-EA), dok je tirozol uglavnom prisutan u obliku oleokantala (p-HPEA- EDA) i monoaldehidnog oblika ligstrozidnog aglikona (p-HPEA-EA) (Kulišić i sur., 2017).

Najviše izmjerene koncentracije gotovo svih spojeva ima sorta Bjelica, jedino cimetne kiseline ima više u višesortnom ulju iz Istre. Vodnjanska crnica ima najniže koncentracije hidroksitirozola, tirozola i pinorezinola. Buža ima najniže koncentracije cimetne kiseline, a

Rosulja ima najnižu izmjerenu koncentraciju apigenina. Utvrđene koncentracije u očekivanim su rasponima u odnosu na podatke iz literature. Ulja Buža i Bjelica imaju čak malo veće koncentracije pinorezinola, cimetne kiseline i apigenina negoli u ranijim istraživanjima autohtonih hrvatskih sorta maslinova ulja (Torić J. i sur., 2020).

Glavni problem zbog kojeg koncentracije oleokantala i oleaceina nisu određene HPLC-DAD metodom je taj što se za ove spojeve nije uspjelo postići kvalitetno razdvajanje pikova na kromatogramu od pikova ostalih spojeva prisutnih u ulju. Opaženo je da ovi spojevi brzo reagiraju s vodom ili metanolom koji se koristi u mobilnoj fazi. Kod obaju spojeva ova spontana reakcija s vodom ili metanolom daje smjesu hemiacetala ili acetala, što se povezivalo s pojavom proširenih ili višestrukih pikova u kromatogramu (Karkoula i sur., 2012). Rezultati kasnijih istraživanja (Sánchez de Medinaa i sur., 2017) dokazali su da upotreba otopina metanola i/ili vode kao mobilne faze za fenolne ekstrakte nije utjecala na nastanak ovih artefakata. Acetali i hemiacetali iz oleokantala i/ili oleacein otkriveni su samo u vrlo niskim koncentracijama. Problem kod razlučivanja pikova vjerojatno je posljedica premale koncentracije ovih spojeva u pripremljenom ekstraktu ulja, koja je bila ispod LOD i LOQ.

4.2. ^{1}H NMR spektar fenolnih ekstrakata

Uz primjenu NMR spektroskopije određen je sadržaj oleokantala i oleaceina. Područje ^{1}H NMR spektra od 9,1 do 9,8 ppm ekstrakata acetonitrila maslinova ulja, zabilježen u $CDCl_3$, predstavlja vrlo dobro razdvojen skup pikova, koji odgovara aldehidnim protonima ispitivanih spojeva. Ovo područje spektra u svim proučenim uzorcima jasno je razdvojeno, što je omogućilo kvantifikaciju ispitivanih spojeva. Kvantifikacija se temelji na integraciji odgovarajućih pikova aldehidnih protona oleokantala na 9,23 ppm i oleaceina na 9,19 ppm te njihovu usporedbu s pikom aldehidnog protonskog signala internog standarda siringaldehida na 9,81 ppm (Karkoula i sur., 2012).

Ispitana su maslinova ulja probranih autohtonih istarskih sorti masline Bjelica (Oleum Viride i Brist), Višesortno ulje Istra, Buža (Brist), Rosulja (Oleum Viride) i Vodnjanska crnica (Oleum Viride). Prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.2 ekstrakcijom s acetonitrilom pripremljeni su fenolni ekstrakti. Snimljeni su ^{1} H NMR spektri iz kojih je očitana površina ispod pikova koji su odgovarali oleokantalu i oleaceinu. Pomoću baždarnih pravaca (Tablica 5.) izračunata je koncentracija pojedinog spoja u mg/mL ekstrakta, a zatim su te vrijednosti preračunate u koncentracije spojeva u mg/kg ulja. Za ulja Bjelica (Brist), Rosulja (Oleum

Viride) i Vodnjanska crnica (Oleum Viride) provedena su mjerenja u duplikatu, tj. pripremljena su po dva ekstrakta koja su dalje obrađena prema opisanom postupku. Za ulja Bjelica (Oleum Viride), Višesortno ulje Istra i Buža (Brist) napravljena su mjerenja na samo jednom ekstraktu (baždarni pravci preuzeti iz Kugić, 2020).

Tablica 7. Koncentracija oleaceina i oleokantala u maslinovim uljima (NMR analiza)

Sorte maslinova ulja	Oleacein (mg/kg ulja)	Oleokantal (mg/kg ulja)
Bjelica Oleum Viride	233	101
Bjelica Brist	232 ± 24	102 ± 18
Višesortno ulje Istra	112	128
Buža Brist	165	72
Rosulja Oleum Viride	189 ± 4	71 ± 3
Vodnjanska crnica Oleum Viride	349 ± 7	112 ± 3

Sadržaj oleokantala i oleaceina u ispitanim maslinovim uljima značajan je u usporedbi s podacima iz literature i varira u maslinovim uljima različitih sorti maslina. Najviša koncentracija oleokantala utvrđena je u Višesortnom ulju iz Istre (128 mg/kg), dok su nešto niže koncentracije zabilježene u uljima sorti Bjelica Oleum Viride (101 mg/kg), Bjelica Brist (102 mg/kg) i Vodnjanska crnica (112 mg/kg). Znatno niže koncentracije oleokantala ima u sortama Buža Brist (72 mg/kg) i Rosulja (71 mg/kg). Kada se ovi rezultati usporede s literaturom, sadržaj oleokantala u ispitanim uljima približan je sadržaju koji je utvrđen u uljima grčkih i kalifornijskih sorti. Koncentracije oleokantala u literaturi kretale su se od nedetektabilnih do 354 mg/kg. Najveće koncentracije oleokantala među uzorcima maslinova ulja iz Grčke zabilježeni su u ulju proizvedenom u Koroneiki (Paros), dostižući maksimum od 711 mg/kg. Za isto je ulje izmjerena i najveća koncentracija oleaceina (588 mg/kg), što je oboje značajno više od koncentracija izmjerenih u ovom diplomskom radu (Karkoula i sur., 2014). U literaturi su zabilježene analize fenolnog sadržaja i nekoliko hrvatskih sorti masline: Drobnica, Krvavica, Lastovka, Buhavica i Oblica. Sadržaj oleokantala je u rasponu 26 – 274 mg/kg, a razine oleaceina 20 – 697 mg/kg (Bilušić i sur., 2017). U drugom literaturnom izvoru analiziran je fenolni sadržaj hrvatskih sorti maslina: Bjelica, Buža, Žižolera i Oblica. Ovdje su utvrđene razine oleokantala bile do maksimalno 140 mg/kg, a razine oleaceina do 440 mg/kg (Kugić, 2020).

Najveća koncentracija oleaceina zabilježena u ovom diplomskom radu je u sorti Vodnjanska crnica (349 mg/kg) , a sljedeća po koncentraciji bila je sortama Bjelica Brist (232 mg/kg) i Bjelica Oleum Viride (233 mg/kg). Najmanji sadržaj oleaceina je u sorti Višesortno ulje Istra (55,3 mg/kg), dok ovo ulje ima najviše oleokantala od svih analiziranih ulja. Zanimljivo je da većina analiziranih maslinovih ulja ima veću koncentraciju oleaceina negoli oleokantala, što je već primijećeno u nekim ranijim analizama hrvatskih autohtonih sorta maslina (Bilušić i sur., 2017; Kugić, 2020). Ovakav odnos koncentracija pak nije primijećen na sortama maslinova ulja iz Grčke i Kalifornije. Kod tih je sorta odnos koncentracija obrnut. Gotovo sva ispitivana ulja imala su veće koncentracije oleokantala nego oleaceina (Karkoula i sur., 2012; Karkoula i sur., 2014). Prema informacijama iz literature, stajanjem maslinova ulja dolazi do razgradnje i oleaceina i oleokantala, ali je oleacein pokazao puno veću nestabilnost (Karkoula i sur., 2012.). Kada se usporede koncentracije polifenola iste sorte (Bjelice), ali različitih proizvođača uviđa se da je koncentracija oleokantala i oleaceina podjednaka. Na temelju toga zapažanja nameće se zaključak da na razliku u koncentracijama polifenola u maslinovim uljima velik utjecaj ima sorta masline (vjerojatno zbog genetskog profila sorte). Ako se koristi jednaka, kvalitetna obrada masline i kasnije jednako dobra pohrana maslinova ulja, razlike između proizvođača ne bi trebale biti jako izražene unutar maslinovih ulja iste sorte masline. Ono što bi moglo raditi veliku razliku u sadržaju sekoiridoidnih fenolnih spojeva poput oleokantala i oleaceina je utjecaj različitih proizvodnih postupaka maslinova ulja (Diamantakos P. i sur., 2020.), što nije bio slučaj kod ovih dvaju ulja. Valja naglasiti da su obje Bjelice proizvedene iz berbe 2020., tako da i tu vidimo još jedan razlog sličnog polifenolnog profila.

4.3. Usporedba ekstrakcijskih postupaka

Uspoređena su dva ekstrakcijska postupka opisana u poglavljima 3.2.1.1. – ekstrakcija 1 (HPLC ekstrakcija) i 3.2.1.2. – ekstrakcija 2 (NMR ekstrakcija). Usporedba je provedena tako da je provedena HPLC analiza ekstrakta ulja, koji je pripremljen prema postupku koji se uobičajeno provodio za NMR analizu (ekstrakcija 2). Taj je uzorak uspoređen s drugim uzorkom ulja, koji je isto analiziran HPLC metodom, ali je uzorak pripremljen ekstrakcijskim postupkom 1, koji je propisan za HPLC analizu. Dva ekstrakcijska postupka uspoređena su kako bi se definirao postupak pripreme ekstrakata za daljnja biološka istraživanja. S obzirom na to da je kod pripreme ekstrakta iz 20g ulja HPLC analizom utvrđeno da je izmjerena koncentracija tirozola ispod granice određivanja, a koncentracija hidroksitirozol ispod granice detekcije u svim ispitanim uzorcima, prilikom pripreme ekstrakta prema postupku ekstrakcije 2 masa početnog uzorka dvostruko je povećana (sa 5 g na 10 g). Povećan je volumen otapala sa 1,7 mL na 2mL

kako bi se suhi eksrakt u potpunosti kvantitativno otopio i prenio sa stijenke tikvice (jer ga sada ima više jer smo koristili duplo više uzorka). Tablica 8. prikazuje rezultate dobivene analizom ekstrakta ulja koji su pripremljeni na dva različita načina i analizirane HPLC metodom.

Tablica 8. Usporedba sadržaja hidroksitirozola, tirozola, pinorezinola, cimetne kiseline i apigenina u ekstraktima ulja koji su pripremljeni uz primjenu dvije različite metode ekstrakcije.

Uzorak maslinova ulja (sorta i vrsta ekstrakcije)	OHTYR*		TYR*		pinorezinol		cimetna kiselina		apigenin	
	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)	C_1 (mg/mL)	C_2 (mg/kg)
Ekstrakcija 1 (HPLC ekstrakcija)	0,0280	2,38	0,0315	2,68	0,0884	7,51	0,0080	0,68	0,0505	4,30
Ekstrakcija 2 (NMR ekstrakcija)	0,0188	3,76	0,0214	4,29	0,0430	3,65	0,0032	0,27	0,0242	2,06

*OHTYR = hidroksitirozol
*TYR = tirozol
*c_1 = koncentracija fenolnog spoja u fenolnom ekstraktu u mg/mL pripremljenog ekstrakta

*c^2 = koncentracija fenolnog spoja u uzorku maslinovog ulja u mg/kg maslinova ulja

*crvena boja polja – izmjerene vrijednosti su ispod LOD i LOQ

* žuta boja polja – izmjerene vrijednosti su iznad LOD, ali ispod LOQ

*zelena boja polja – izmjerene vrijednosti su iznad LOD I LOQ

Koncentracije tirozola u ekstraktima pripremljenim NMR ekstrakcijom manje su negoli koncentracije dobivene HPLC ekstrakcijom i ispod granice detekcije. Koncentracije su hidroksitirozola u obama ekstraktima ispod granice detekcije. Koncentracija pinorezinola i apigenina u NMR ekstraktima dvostruko je manja u usporedbi s HPLC ekstrakcijom (sa 0,0884 na 0,0430 mg/kg i sa 0,0505 na 0,0242 mg/kg). Izmjerena koncentracija cimetne kiseline u NMR ekstraktu su ispod granice određivanja. Na temelju dobivenih rezultata jasno se uviđa da se dvije metode ekstrakcije ne mogu jednoznačno zamijeniti prilikom provođenja HPLC analize. Koncentracije svih parametara zbog neodgovarajuće ekstrakcije smanjene su u ekstraktima pripremljenim prema postupku ekstrakcije 2 u usporedbi s ekstraktima pripremljenim prema postupku ekstrakcije 1.

Dva ekstrakcijska postupka opisana u poglavljima 3.2.1.1. – ekstrakcija 1 (HPLC ekstrakcija) i 3.2.1.2. – ekstrakcija 2 (NMR ekstrakcija) međusobno su uspoređena tako što je za oba

provedena NMR analiza. Ekstrakt ulja koji je pripremljen prema postupku koji se uobičajeno provodio za HPLC analizu (ekstrakcija 1) uspoređen je s uzorkom ulja koji je isto analiziran NMR metodom, ali je uzorak pripremljen ekstrakcijskim postupkom propisanim za NMR ekstrakciju (ekstrakcija 2). Cilj je ove usporedbe bio utvrditi optimalni postupak pripreme ekstrakta za daljnja biološka istraživanja. Uzorci dobiveni ekstrakcijskim postupkom 2 napravljeni su u duplikatu, dok je ekstrakcija 1 provedena samo jedanput. U Tablici 9. prikazani su rezultati NMR analize.

Tablica 9. Usporedba sadržaja oleaceina i oleokantala u ekstraktima ulja koji su pripremljeni uz primjenu dviju različitih metoda ekstrakcije.

ULJE	Koncentracija oleacein (mg/kg ulja)	Koncentracija oleokantal (mg/kg ulja)
Ekstrakcija 2 (NMR ekstrakcija)	349 ± 7	112 ± 3
Ekstrakcija 1 (HPLC ekstrakcija)	264	110

Kao što je vidljivo u Tablici 9. koncentracija oleaceina u uzorku dobivenom s NMR ekstrakcijom iznosi 349 mg/kg, a koncentracija oleokantala iznosi 112 mg/kg. Isto je tako vidljivo da koncentracija oleaceina u uzorku dobivenom s HPLC ekstrakcijom iznosi 264 mg/kg, a koncentracija oleokantala iznosi 110 mg/kg. Kod obaju postupaka ekstrakcije utvrđena je gotovo identična koncentracija oleokantala, ali poprilično različita koncentracija oleaceina. Na temelju dobivenih rezultata analize dvije metode ekstrakcije ne mogu se jednoznačno zamijeniti prilikom provođenja NMR analize. Koncentracije oleaceina zbog neodgovarajuće ekstrakcije smanjene su u ekstraktima pripremljenim prema postupku ekstrakcije 1 u usporedbi s ekstraktima pripremljenim prema postupku ekstrakcije 2. Zanimljivo je opažanje da promjena ekstrakcijskog postupka nije značajno utjecala na izmjerenu koncentraciju oleokantala u pripremljenim ekstraktima.

5) ZAKLJUČAK

Određen je sadržaj biološki aktivnih spojeva: tirozola, homovanilina, *o*-kumarinske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, cimetne kiseline, oleaceina i oleokantala koji se ističu po biološkim učincima u organizmu. Ispitano je 13 fenolnih ekstrakata pripremljenih od 6 maslinovih ulja uz primjenu NMR i HPLC metoda za analizu.

Na temelju rezultata analize moguće je zaključiti sljedeće:

1. Provedena analiza uz oba ekstrakcijska postupka pokazala je da sadržaj svih ispitanih spojeva varira ovisno o tome koji je ekstrakcijski postupak primijenjen. Nije dokazan jedinstveni ekstrakcijski postupak prema kojem bi se pripremali uzorci za daljnja biološka ispitivanja, a da se pritom dobiveni rezultati bioloških pokusa mogu povezivati sa sadržajem svih navedenih fenolnih spojeva.
2. Dva korištena ekstrakcijska postupka zadovoljavajuća su i primjenjiva za onu metodu za koju je pojedina ekstrakcija propisana. Usporedbe tih metoda provedene na opisan način ipak nisu dale zadovoljavajuće rezultate. Koncentracije ispitivanih fenola bile su niže kod ekstrakcija koje inače nisu propisane za pojedinu metodu, što dovodi do zaključka da se ekstrakcije ne mogu jednoznačno zamijeniti bez gubitka na kvaliteti ekstrahiranja spojeva iz uzorka.
3. U većini ispitanih sorti sadržaj oleaceina bio je viši od sadržaja oleokantala, što je u skladu s dosad dostupnim podacima o hrvatskim sortama, dok je suprotan odnos tih dvaju fenola utvrđen u većini maslinovih ulja drugih geografskih područja.
4. Sadržaj fenolnih spojeva razlikuje se u uljima različitih sorta. Fenolni ekstrakti posebno su bogati biološki aktivnim spojevima oleokantalom i oleaceinom, čiji je sadržaj kvantitativno određen ^{1}H NMR tehnikom
5. Zaključci ovog diplomskog rada će se dalje primjenjivati u budućim ispitivanjima povezanosti sadržaja navedenih fenolnih spojeva i biološkog učinka maslinova ulja na stanice melanoma.

6) LITERATURA

Alowaiesh B, Singh Z, Fang Z, Kailis SG. Harvest time impacts the fatty acid compositions, phenolic compounds and sensory attributes of Frantoio and Manzanilla olive oil. Scientia Horticulturae, 2018, 234, 74–80.

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, 67, 326–336.

Bilušić T, Žanetić M, Ljubenkov I, Generalić Mekinić I, Štambuk S, Bojović V, Soldo B, Magiatis P. Molecular characterization of Dalmatian cultivars and the infuence of the olive fruit harvest period on chemical profle, sensory characteristics and oil oxidative stability. Eur Food Res Technol 244 (2017) 281–289.

Boskou D. Olive oil chemistry and technology. Second edition., Champaign, Ill inois: AOCS Press, 2006.

Carbajo RJ, Neira JL. NMR for Chemists and Biologists. Springer Netherlands, 2013, 2–5, 12, 23.

Cheilari A, Sturm S, Intelmann D, Seger C, Stuppner H. Head-to-Head Comparison of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection versus Quantitative Nuclear Magnetic Resonance for the Quantitative Analysis of the Silymarin Complex in Silybum marianum Fruit Extracts. J. Agric. Food Chem., 2016, 64, 1618−1626.

Criado MN, Romero MP, Casanovas M, Motilva MJ. Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. Food Chem., 2008, 110, 873–880.

de la Torre, R. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. Inflammopharmacology, 2008, 16, 245–247.

Debbabi M, Nury T, Zarrouk A, Mekahli N, Bezine M, Sghaier R, Grégoire S, Martine L, Durand P, Camus E, Vejux A, Jabrane A, Bretillon L, Prost M, Moreau T, Ammou SB, Hammami M, Lizard G. Protective Effects of α-Tocopherol, γ-Tocopherol and Oleic Acid, Three Compounds of Olive Oils, and No Effect of Trolox, on 7-Ketocholesterol-Induced Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunction in Microglial BV-2. Cells Int. J. Mol. Sci., 2016, 17, 1–25.

De las Hazas MCL, Godinho-Pereira J, Macia A, Almeida AF, Ventura MR, Motilva M.-J., Santos CJ. Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. *J. Funct. Food.* 2018; 46: 107–110.

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, 2449.

Francisco V, Ruiz-Fernández C, Lahera V, Lago F, Pino J, Skaltsounis L, González-Gay MA, Mobasheri A, Gómez R, Scotece M, Gualillo O. Natural Molecules for Healthy Lifestyles: Oleocanthal from Extra Virgin Olive Oil. J Agric Food Chem. 2019, 67 (14), 3845–3853.

Franco MN, Galeano-Diaz T, Lopez O, Fernandez-Bolaños JG, Sanchez J, de Miguel C, Gil MV,Martin-Vertedor D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. Food Chem., 2014, 163, 289–298.

Friebolin H. Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy (3.izd.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1998.

Jakobušić Brala C, Benčić D, Šindrak Z, Barbarić M, Uršić S. Labeled extra virgin olive oil as food supplement; phenolic compounds in oils from some autochthonous Croatian olives. Grasas aceites [Internet]. 2015Dec.30 [cited 2021Oct.13]; 66(4): e099.

Jerman Klen T, Mozetič Vodopivec B. Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. Food Chem., 2012, 134, 2481–2488.

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.

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

Kazakevich Y., LoBrutto R., HPLC for pharmaceutical scientists, John Wiley and Sons Ltd, 2007., 7–13.

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. Am J Epidemiol. 1986 Dec;124(6):903–15.

Kulišić Bilušić T, Melliou E, Giacometti J, Čaušević A, Čorbo S, Landeka M, Magiatis P. Phenolics, fatty acids, and biological potential of selected Croatian EVOOs. Eur J Lipid Sci Technol. 119 (2017) 1–16.

Kugić A. Kvantitativna 1 H NMR analiza sekoiridoidnih fenolnih spojeva i masnih kiselina u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline, 2020., (rad nagrađen Rektorovom nagradom).

Lopez S, Pacheco YM, Beatriz Bermt'.1dez B, Abia R, Muriana FJG. Olive oil and cancer. Grasas Aceites. 2004; 55: 33–41.

Lozano-Castellón J, López-Yerena A, Rinaldi de Alvarenga JF, Romero del Castillo-Alba J, Vallverdú-Queralt A, Escribano-Ferrer E, Lamuela-Raventós RM. Health-promoting properties of oleocanthal and oleacein: Two secoiridoids from extra-virgin olive oil.Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 2532–2548.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveuĉilińta u Zagrebu, 2012, 204, 222–224.

Moldoveanu S, David V. Essentials in Modern HPLC Separations. Cambridge (Massachusetts), Elsevier, 2012, 9–38.

Moldoveanu S, David V. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Cambridge (Massachusetts), Elsevier, 2016, 71–76.

Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41, 2228–2234.

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.

Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spielgelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. Food Chemistry Toxicology, 2000, 38, 647–659.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009, 2, 270–278.

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

Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Fregapane G, Salvador MD, Simal-Gándara J. Characterisation of extra virgin olive oils from Galician autochthonous varieties and their co-crushings with Arbequina and Picual cv. Food Chem., 2015, 176, 493–503.

Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. Int J Mol Sci, 2016, 17, 843.

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

Romero MP, Tovar MJ, Ramo T, Motilva MJ. Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin „Les Garrigues.“ *J. Am. Oil Chem. Soc*., 2003, 80, 423–430.

Sánchez de Medinaa V, Mihod H, Mellioue E, Magiatise P, Priego-Capotea F, Luque de Castroa MD. Quantitative method for determination of oleocanthal and oleacein in virgin olive oils by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Talanta, 2017, 162, 24–31.

Sánchez de Medina, V., Priego-Capote, F. and Luque de Castro, M. D. Characterization of monovarietal virgin olive oils by phenols profiling. Talanta, 2015, 132, 424–432.

Santis S, Cariello M, Piccinin E, Sabbà C, Moschetta A. Extra virgin olive oil: lesson from nutrigenomics. Nutrients. 2019, 11(9): E2085.

Scherf-ClavelO. Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore. Disertacija, 2016.

Segura-Carretero A, Curiel J A. Current disease-targets for oleocanthal as promising natural therapeutic agent. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 2899.

Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. Antioxidants, 2014, 3, 1–23.

Sinesi A, Damato R. Extra Virgin Olive Oil (Evoo) As A Valid Functional Food in the Oral Cavity. Nov Tech Nutri Food Sci. 5 (4). NTNF. 000617. 2021.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis. U: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Boston, Cengage Learning, 2016, 453–500.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. U: Osnove analitičke kemije. Skoog DA, West Dm, Holler FJ, Zagreb, Školska knjiga, 1999, 692–716.

Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barberić A. Ukupne fenolne rvari u sormim istarskim maslinovim uljima. Pomologia Croatica. 2007; 13, 17–30.

Talhaoui N, Gómez-Caravaca AM, León L, De la Rosa R, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. Food Sci. Technol., 2014, 58, 28–34.

Torić J, Barbarić M , Uršić S, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Zebić Avdičević M, Đani Benčić Đ. Antique Traditional Practice: Phenolic Profile of Virgin Olive Oil Obtained from Fruits Stored in Seawater. Foods, 2020a, 9, 1347.

Torić J, Brozović A, Baus Lončar M, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Benčić Đ, Barbarić M. Biological Activity of Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils through Their Phenolic Profile and Their Combination with Anticancer Drugs Observed in Human Cervical Carcinoma and Colon Adenocarcinoma Cells. Antioxidants, 2020b, 9, 453.

Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. J. Nutr., 2002, 132, 409–417.

Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. Pomologia Croatica, 2006, 12, 159–173.

Wani TA, Masoodi FA, Gani A, Baba WN, Rahmanian N, Akhter R, Wani IA, Ahmad M. Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. Trends in Food Science and Technology, 2018, 77, 77–90.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, 146–148.

7) SAŽETAK/SUMMARY

Maslinovo ulje namirnica je koja ima impresivan kemijski sastav, a posebno je zanimljiv njezin sadržaj polifenola, čije se antioksidativno djelovanje na organizam razvija, čak i pri niskim koncentracijama. Jedan je od važnijih ciljeva prilikom analize polifenola u maslinovu ulju dobiti što točniji odnos između izmjerene (stvarne) koncentracije komponente u uzorku s koncentracijom koja u konačnici dospije do ciljnih mjesta u organizmu i djeluje na biološke procese. HPLC i NMR dvije su standardizirane metode za određivanje sadržaja određenih fenolnih spojeva u ekstraktima maslinovih ulja. Sadržaj oleokantala i oleaceina određivao se u ekstraktima koji su pripremljeni primjenom acetonitrila i cikloheksana i primjenom NMR spektroskopije, dok se sadržaj hidroksitirozola, tirozola, pinorezinola, cimetne kiseline i apigenina odredio u ekstraktima koji su pripremljeni primjenom metanola i heksana primjenom HPLC-DAD spektroskopije. Ispitan je polifenolan sastav šest maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline: Rosulja (Oleum Viride), Buža (Brist), Bjelica (Brist i Oleum Viride), Vodnjanska crnica (Oleum Viride) i Višesortno ulje Istra. Sadržaj pojedinih fenolnih spojeva razlikovao se ovisno o sorti masline. U većini ispitanih sorti sadržaj oleaceina bio je viši od sadržaja oleokantala, što je u skladu s dosad dostupnim podacima o hrvatskim sortama, dok je suprotan odnos tih dvaju fenola utvrđen u većini maslinovih ulja drugih geografskih područja. Ispitana maslinova ulja mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica i ona upućuju na iznimnu kvalitetu ovih ulja s područja Republike Hrvatske. Nakon provedenih analiza uspoređene su obje metode ekstrakcije kako bi se utvrdio optimalni postupak pripreme ekstrakta za daljnja biološka istraživanja. Postupak je proveden tako da su oba ekstrakta puštena i na HPLC i na NMR (bez obzira na to za koju je metodu ekstrakcija razvijena). Usporedbe ekstrakcijskih metoda ipak nisu dale zadovoljavajuće rezultate.

SUMMARY

Olive oil is a food that has an impressive chemical composition and it is especially interesting in the context of polyphenols, whose antioxidant activity in the body develops even at low concentrations. One of the most important goals in the analysis of polyphenols in olive oil is to obtain the most accurate relationship between the measured (actual) concentration of the component in the sample with the concentration that ultimately reaches targeted sites in the cells and affects biological processes in them. HPLC and NMR are two standardized methods for determining the concentration of certain phenolic compounds in olive oil extracts. The concentration of oleocanthal and oleacein was determined in extracts prepared using acetonitrile and cyclohexane and analysed by NMR spectroscopy, while the concentration of hydroxytyrosol, tyrosol, pinoresinol, cinnamic acid and apigenin was determined in extracts prepared using methanol and hexane using HPLC-DAD spectroscopy.The polyphenolic composition of six olive oils of autochthonous Croatian olive varieties was tested: Rosulja (Oleum Viride), Buža (Brist), Bjelica (Brist and Oleum Viride), Vodnjanska crnica (Oleum Viride) and Multi-varietal oil Istra. The content of individual phenolic compounds differed depending on the olive variety. In most of the examined cultivars, the oleacein concentration was higher than the oleocanthal, which is in line with the previous data available so far on Croatian cultivars, while the opposite ratio of these two phenols was found in olive oils cultivated in other geographical regions. The tested olive oils can be considered a good source of polyphenolic components and indicator of the exceptional quality of these oils from the territory of the Republic of Croatia. After analysis, both methods of extractions were compared in order to determine the optimal procedure for preparing the extracts for further biological research. The procedure was performed so that both extracts were run on both HPLC and NMR (regardless of which extraction method was used). However, comparisons of these two methods for extraction did not give satisfactory results.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za fizikalnu kemiju
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

HPLC-DAD i NMR analiza polifenola u maslinovom ulju

Leona Burčak

SAŽETAK

Maslinovo ulje namirnica je koja ima impresivan kemijski sastav, a posebno je zanimljiv njezin sadržaj polifenola, čije se antioksidativno djelovanje na organizam razvija, čak i pri niskim koncentracijama. Jedan je od važnijih ciljeva prilikom analize polifenola u maslinovu ulju dobiti što točniji odnos između izmjerene (stvarne) koncentracije komponente u uzorku s koncentracijom koja u konačnici dospije do ciljnih mjesta u organizmu i djeluje na biološke procese. HPLC i NMR dvije su standardizirane metode za određivanje sadržaja određenih fenolnih spojeva u ekstraktima maslinovih ulja. Sadržaj oleokantala i oleaceina određivao se u ekstraktima koji su pripremljeni primjenom acetonitrila i cikloheksana i primjenom NMR spektroskopije, dok se sadržaj hidroksitirozola, tirozola, pinorezinola, cimetne kiseline i apigenina odredio u eksztraktima koji su pripremljeni primjenom metanola i heksana primjenom HPLC-DAD spektroskopije. Ispitan je polifenolan sastav šest maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline: Rosulja (Oleum Viride), Buža (Brist), Bjelica (Brist i Oleum Viride), Vodnjanska crnica (Oleum Viride) i Višesortno ulje Istra. Sadržaj pojedinih fenolnih spojeva razlikovao se ovisno o sorti masline. U većini ispitanih sorti sadržaj oleaceina bio je viši od sadržaja oleokantala, što je u skladu s dosad dostupnim podacima o hrvatskim sortama, dok je suprotan odnos tih dvaju fenola utvrđen u većini maslinovih ulja drugih geografskih područja. Ispitana maslinova ulja mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica i ona upućuju na iznimnu kvalitetu ovih ulja s područja Republike Hrvatske. Nakon provedenih analiza uspoređene su obje metode ekstrakcije kako bi se utvrdio optimalni postupak pripreme ekstrakta za daljnja biološka istraživanja. Postupak je proveden tako da su oba ekstrakta puštena i na HPLC i na NMR (bez obzira na to za koju je metodu ekstrakcija razvijena). Usporedbe ekstrakcijskih metoda ipak nisu dale zadovoljavajuće rezultate.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 6 grafičkih prikaza, 9 tablica i 54 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: polifenoli, maslinovo ulje, NMR, HPLC, oleacein, oleokantal

Mentor: **dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala,** *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
dr. sc. Monika Barbarić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala,** *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
dr. sc. Monika Barbarić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
dr. sc. Ana Karković Marković, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: prosinac 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Physical Chemistry
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

HPLC-DAD i NMR analysis of polyphenols in olive oil

Leona Burčak

SUMMARY

Olive oil is a food that has an impressive chemical composition and it is especially interesting in the context of polyphenols, whose antioxidant activity in the body develops even at low concentrations. One of the most important goals in the analysis of polyphenols in olive oil is to obtain the most accurate relationship between the measured (actual) concentration of the component in the sample with the concentration that ultimately reaches targeted sites in the cells and affects biological processes in them. HPLC and NMR are two standardized methods for determining the concentration of certain phenolic compounds in olive oil extracts. The concentration of oleocanthal and oleacein was determined in extracts prepared using acetonitrile and cyclohexane and analysed by NMR spectroscopy, while the concentration of hydroxytyrosol, tyrosol, pinoresinol, cinnamic acid and apigenin was determined in extracts prepared using methanol and hexane using HPLC-DAD spectroscopy.The polyphenolic composition of six olive oils of autochthonous Croatian olive varieties was tested: Rosulja (Oleum Viride), Buža (Brist), Bjelica (Brist and Oleum Viride), Vodnjanska crnica (Oleum Viride) and Multi-varietal oil Istra. The content of individual phenolic compounds differed depending on the olive variety. In most of the examined cultivars, the oleacein concentration was higher than the oleocanthal, which is in line with the previous data available so far on Croatian cultivars, while the opposite ratio of these two phenols was found in olive oils cultivated in other geographical regions. The tested olive oils can be considered a good source of polyphenolic components and indicator of the exceptional quality of these oils from the territory of the Republic of Croatia. After analysis, both methods of extractions were compared in order to determine the optimal procedure for preparing the extracts for further biological research. The procedure was performed so that both extracts were run on both HPLC and NMR (regardless of which extraction method was used). However, comparisons of these two methods for extraction did not give satisfactory results.

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

Thesis includes: 44 pages, 6 figures, 9 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: polyphenols, olive oil, NMR, HPLC, oleacein, oleocanthal

Mentor: **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*

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
Ana Karković Marković, **Ph.D.** *Post Doctoral,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2021.