

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Azra Kugić

**Kvantitativna ^1H NMR analiza sekoiridoidnih
fenolnih spojeva i masnih kiselina u maslinovom
ulju autohtonih hrvatskih sorti masline**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorskim vodstvom doc. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala. Predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

POPIS KRATICA

ACE	Angiotenzin konvertirajući enzim (<i>Angiotensin-converting enzyme</i>)
AD	Alzheimerova bolest (<i>Alzheimer's disease</i>)
ADDL	Topljivi oligomerni oblici β amiloidnog peptida (<i>Amyloid-derived diffusible ligands</i>)
COX	Ciklooksigenaza
EGFR	Receptor epidermalnog faktora rasta (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
EMZ	Elektromagnetsko zračenje
EPS	Endotelne progenitorne stanice
FDA	Agencija za hranu i lijekove (<i>Food and Drug Administration</i>)
FID	Ovisnost inzititeta signala o vremenu (<i>Free induction decay</i>)
GM-CSF	Faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HER2	Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HGF	Hepatocitni faktor rasta (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
IL	Interleukin
iNOS	Inducibilna NO sintaza
LDL	Lipoproteini niske gustoće (<i>Low density lipoproteins</i>)
LOD	Granica dokazivanja (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Granica određivanja (<i>Limit of quantification</i>)
LRP1	Protein sličan LDL receptoru 1 (<i>LDL Receptor related protein 1</i>)
MIP-1 α	Makrofagni upalni protein 1 α (<i>Macrophage inflammatory protein 1α</i>)

MK	Masne kiseline
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija
NO	Dušikov oksid (<i>Nitric oxide</i>)
OA	Osteoartritis
RF puls	Puls radiofrekvencijskog zračenja
ROS	Reaktivni kisikovi spojevi (<i>Reactive oxygen species</i>)
RSD	Relativna standardna devijacija
SD	Standardna devijacija
TNF- α	Faktor nekroze tumora α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>World Health Organization</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Maslinovo ulje – korak bliže zdravom starenju.....	1
1.2. Maslinovo ulje	2
1.2.1. Mediteranska prehrana	2
1.2.2. Kemijski sastav i biomedicinski značaj maslinovog ulja	3
1.2.2.1. Oleokantal.....	5
1.2.2.2. Oleacein	7
1.3. NMR spektroskopija	9
1.3.1. Kvantitativna ^1H NMR analiza maslinovog ulja	10
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Uzorci maslinovog ulja	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju	13
3.2.1.1. Ekstrakcija sekoiridoidnih fenolnih spojeva iz maslinovog ulja	13
3.2.1.2. Priprema otopine internog standarda.....	14
3.2.1.3. Kvantitativna ^1H NMR spektroskopija fenolnog ekstrakta maslinovog ulja...14	
3.2.1.4. Izrada baždarnih pravaca za određivanje oleokantala i oleaceina	15
3.2.1.4.1. Priprema otopina standarda oleokantala i oleaceina.....	16
3.2.1.5. Validacija metode.....	16
3.2.2. Određivanje udjela masnih kiselina u maslinovom ulju	17
3.2.2.1. Polu-kvantitativna ^1H NMR spektroskopija maslinovog ulja.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18

4.1. Određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline	18
4.1.1. ¹ H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja.....	18
4.1.2. Optimizacija postavki snimanja i obrade ¹ H NMR spektara.....	19
4.1.3. Baždarni pravci za određivanje oleokantala i oleaceina	24
4.1.3.1. Odabir maslinovog ulja za izradu baždarnih pravaca.....	24
4.1.3.2. Baždarni pravac za određivanje oleokantala.....	26
4.1.3.3. Baždarni pravac za određivanje oleaceina.....	28
4.1.4. Određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva u uzorcima maslinovog ulja autohtonih hrvatskih sorti masline.....	31
4.1.4.1. Određivanje sadržaja oleokantala i oleaceina	31
4.1.4.2. Polu-kvantitativno određivanje sadržaja oleuropein i ligstrozid aglikona	34
4.1.5. Validacija metode	36
4.1.5.1. Selektivnost.....	36
4.1.5.2. Preciznost.....	37
4.1.5.3. Linearnost	39
4.1.5.4. Osjetljivost	40
4.2. Određivanje udjela masnih kiselina u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline	42
4.2.1. Udio masnih kiselina u maslinovom ulju	45
5. ZAKLJUČCI	47
6. ZAHVALE	49
7. POPIS LITERATURE	50
8. SAŽETAK.....	59
9. SUMMARY	60
PRILOZI.....	61

1. UVOD

1.1. Maslinovo ulje – korak bliže zdravom starenju

Najnovije medicinske spoznaje i dostignuća doprinijeli su znatnom produljenju životnog vijeka ljudi u posljednjih nekoliko desetljeća. Usprkos ovakvom nevjerojatnom znanstvenom procvatu, zabilježena je povećana incidencija kroničnih i neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starijom životnom dobi i nepovoljnim načinom života (1). Proces starenja uključuje znatan broj nepovoljnih promjena u ljudskom tijelu, kao što su disfunkcija mitohondrija, genomske i epigenetske promjene, određene izmjene unutarstaničnih signalnih puteva i narušavanje normalnog smatanja i funkcije proteina (2). Kontinuirano nakupljanje staničnih oštećenja, kao i utišavanje citoprotektivnih procesa, dovodi do razvoja brojnih patoloških stanja (3).

Upravo se maslinovo ulje, kao dio tzv. mediteranske prehrane, već dugi niz godina povezuje s produljenjem životnog vijeka i smanjenim rizikom nastanka bolesti povezanih sa starijom životnom dobi, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, metabolički sindrom, pretilost, Alzheimerova i Parkinsonova bolest (2, 4, 5). Posebna se pažnja pridaje fenolnoj frakciji maslinovog ulja koja se, iako predstavlja manjinski udio u ukupnom sadržaju, smatra odgovornom za većinu farmakoloških učinaka koji mu se pripisuju. Spomenuti povoljni učinci odraz su antioksidativnog, protuupalnog, i drugih djelovanja polifenolih spojeva (4). Među njima, sekoiridoidi i njihovi derivati poput oleokantala i oleaceina pokazuju ohrabrujuće rezultate kao spojevi citoprotektivnih svojstava, promovirajući ideju tzv. „zdravog starenja“ (engl. *healthy ageing*) (6). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), zdravo starenje odnosi se na očuvanje kvalitete života i funkcionalnih sposobnosti potrebnih za postizanje psihofizičkog blagostanja i njegovog održavanja u starijoj životnoj dobi (7). Usvajanje ključnih aspekata mediteranske prehrane prepoznato je kao važan iskorak prema ostvarenju takvog cilja.

1.2. Maslinovo ulje

1.2.1. Mediteranska prehrana

Neupitna povezanost prehrambenih navika i općeg zdravstvenog stanja populacije već je dulje vrijeme u fokusu brojnih znanstvenih istraživanja. Kao jedan od prepoznatljivijih obrazaca prehrane ističe se mediteranska prehrana, svojstvena za zemlje Sredozemlja u ranim 60-im godinama prošlog stoljeća. Temelji se na visokom unosu voća, povrća, orašastih plodova, mahunarki i žitarica te umjerenom unosu mesa, ribe i mliječnih proizvoda (8).

Neizostavan dio mediteranske prehrane predstavlja maslinovo ulje kao glavni izvor masti, a upravo se ono svrstava među komponente najzaslužnije za mnogobrojne korisne učinke na organizam, pogotovo one koji se odnose na krvožilni sustav. Kardiovaskularne bolesti predstavljaju velik izazov današnjem zdravstvenom sustavu. WHO 2016. godine, u razdoblju od godinu dana, bilježi 15,2 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih ishemijskom bolesti srca i moždanim udarom, što ih stavlja na sam vrh ljestvice vodećih uzroka smrti u svijetu. Sličan trend zabilježen je posljednjih nekoliko desetljeća (9). Brojna istraživanja ukazuju na to kako je upravo mediteranski način prehrane usko povezan sa smanjenjem broja kardiovaskularnih incidenata kod visokorizične populacije (10, 11). Ovakvi podaci ukazuju na iznimnu važnost ovog načina ishrane kao jednog od ključnih nefarmakoloških faktora u smanjenju mortaliteta na globalnoj razini.

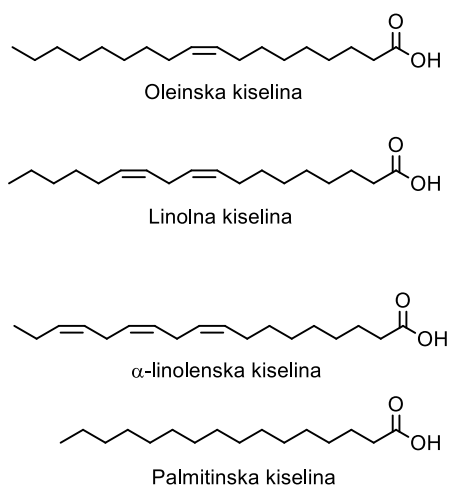
Mehanizmi temeljem kojih se ispoljava povoljno djelovanje mediteranske prehrane nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se kako, između ostalog, poboljšanje lipidnog statusa te smanjenje oksidativnog stresa i upalnih biomarkera poput interleukina (IL) 6 i faktora nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor*, TNF- α) uvelike doprinose pozitivnim učincima (12, 13). Neki od njih očituju se u vidu smanjene incidencije neurodegenerativnih oboljenja poput Parkinsonove bolesti (14) te različitih oblika demencije, a ako su blaži kognitivni poremećaji već prisutni, manja je vjerojatnost njihove progresije do Alzheimerove bolesti (15, 16). Pored toga, zabilježeni su i pozitivni efekti na prevenciju i menadžment metaboličkog sindroma (17) te na smanjenje smrtnosti uzrokovane određenim tumorskim oboljenjima (18).

1.2.2. Kemijski sastav i biomedicinski značaj maslinovog ulja

Širok spektar primijećenih pozitivnih biomedicinskih učinaka, kao i cijeli niz različitih spojeva, doprinose percepciji maslinovog ulja kao nepresušnog izvora novih saznanja. Blagotvoran učinak maslinovog ulja na zdravlje prvenstveno se očituje u obliku njegovih kardio i neuroprotektivnih učinaka. Smanjenje oksidativnog stresa i krvnog tlaka te održavanje povoljne endotelne funkcije, kao i glikemijske ravnoteže kod osoba oboljelih od dijabetesa samo su još neki od njegovih brojnih povoljnih učinaka na organizam (19, 20).

Poznato je kako gotovo 99% sadržaja maslinovog ulja čine trigliceridi, dok se preostali dio sastoji od mono i diglicerida, slobodnih masnih kiselina, fenolnih spojeva, ugljikovodika, sterola, alifatskih alkohola, tokoferola i pigmenata. Svaka navedena skupina spojeva na svoj osebujan način pridonosi specifičnim organoleptičkim svojstvima i prepoznatljivosti pojedinih vrsta maslinovih ulja (21, 22).

Ulja različitih sorti masline razlikuju se po kvantitativnom sastavu masnih kiselina. Najveću količinu predstavljaju mononezasićene masne kiseline, one koje u svojoj strukturi imaju jednu dvostruku vezu, a među njima najzastupljenija je oleinska kiselina (C18:1) (Slika 1) (21). Prema Američkoj Agenciji za hranu i lijekove (FDA), postoje naznake o tome kako je upravo oleinska kiselina jedan od ključnih čimbenika zaslužnih za smanjenje rizika nastanka koronarne bolesti srca (23). Kao mogući mehanizam takvog djelovanja navodi se smanjenje krvne razine lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*, LDL), kao i hipotenzivni učinak oleinske kiseline posredovan promjenom lipidne strukture membrana i stanične signalizacije (24).



Slika 1. Oleinska, linolna, α -linolenska i palmitinska kiselina

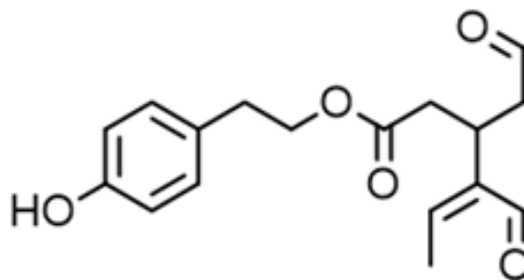
Pored oleinske kiseline, prisutne su i polinezasićene masne kiseline kao što su linolna (C18:2) i α -linolenska kiselina (C18:3) te zasićena palmitinska kiselina (C16:0) (Slika 1). Linolna i α -linolenska kiselina spadaju u esencijalne masne kiseline što znači da ih je nužno unositi prehranom, zato što ne postoji mogućnost njihove sinteze u organizmu. Njihova količina u različitim biljnih uljima znatno varira zbog toga što su vrlo podložne oksidaciji. Maslinovo ulje, za razliku od ostalih ulja, zbog prisutnosti oleinske kiseline i spojeva antioksidativnog potencijala, odlikuje se većim stupnjem otpornosti prema oksidaciji (20, 24).

Fenolnim spojevima pripisuje se niz povoljnih učinaka na zdravlje, iako čine manjinsku frakciju maslinovog ulja. Riječ je o vrlo heterogenoj skupini spojeva. Zajednička strukturna karakteristika fenolnih spojeva aromatska je jezgra s jednom ili više hidroksilnih skupina. Nisu neophodni za rast, razvoj i razmnožavanje biljaka te se iz tog razloga svrstavaju u sekundarne metabolite, ali pokazuju cijeli spektar pozitivnih učinaka, od kemijskog signaliziranja pa sve do zaštite biljaka od ultraljubičastog zračenja, patogena i biljojeda. Odgovorni su za prepoznatljiv gorak i oporan okus ulja, a također i za njegovu iznimnu stabilnost i kvalitetu (20).

Najznačajnijim fenolnim spojevima maslinovog ulja smatraju se jednostavni fenoli poput hidroksitirozola i tirozola te sekoiridoidi i njihovi derivati kao što su oleuropein, oleokantal i oleacein te oleuropein i ligstrozid aglikon. Kao molekule iznimnih antioksidativnih svojstava, štiteći stanice od oksidativnih promjena ispoljavaju niz svojih *in vitro* i *in vivo* farmakoloških učinaka, počevši od antiaterogenog te kardio i neuroprotektivnog djelovanja, sve do antidijabetičkih, antialergijskih te imunomodulatornih učinaka. Pored njih, po svojoj zastupljenosti i povoljnom djelovanju ističu se flavonoidi kao što su rutin i kvercetin te fenolne kiseline poput kavene, vanilinske te *p*- i *o*-kumarinske kiseline (20, 22).

1.2.2.1. Oleokantal

Oleokantal (Slika 2) već je dugi niz godina prepoznat kao neiscrpan izvor novih istraživanja. Poznat je i pod nazivom deacetoksi-ligstrozid aglikon, u prirodi je prisutan samo njegov (-)-enantiomer (3*S*, 4*E*) (25). Najznačajniji učinci oleokantala zabilježeni su na području liječenja neurodegenerativnih bolesti, tumora različite etiologije kao i upalnih reumatskih stanja (26).



Slika 2. Oleokantal.

Prepoznatljiv blago nadražujući okus oleokantala sličan je gorkom okusu ibuprofena, neselektivnog inhibitora ciklooksigenaza (COX) 1 i 2, ključnih enzima u biosintetskom putu prostaglandina. Pokazalo se kako osim toga, oleokantal i ibuprofen dijele i sličan farmakološki učinak, štoviše, u *in vitro* uvjetima pokazano je kako oba enantiomera oleokantala inhibiraju COX 1 i 2 enzime u znatno većoj mjeri nego ibuprofen, pri istim koncentracijama (27).

Osteoarthritis (OA) degenerativna je bolest zglobova većinom prisutna kod starije populacije, a karakterizira ju upala i uništavanje zglobne hrskavice što u konačnici vodi do gubitka funkcije zahvaćenih zglobova (28). Prisutni proupalni citokini svojim djelovanjem potiču sintezu enzima koji razgrađuju hrskavicu te sintezu prostaglandina E2 i dušikovog oksida (engl. *nitric oxide*, NO). Inducibilna NO sintaza (iNOS), jedan od enzima zaslužnih za sintezu NO, povezuje se s razvojem patoloških upalnih stanja prisutnih kod OA (29). Pokazalo se kako oleokantal smanjuje ekspresiju iNOS u hondrocitima, a time i sintezu NO (30). Smanjenju razine prostaglandina, poznatih medijatora upale i boli, oleokantal doprinosi već spomenutom inhibicijom COX 1 i 2 enzima (27). Njegov učinak ispitan je i na makrofagima te je otkriveno kako umanjuje mRNA ekspresiju i sintezu makrofagnog upalnog proteina 1 α (engl. *macrophage inflammatory protein 1 α* , MIP-1 α) i IL-6, kao i sintezu ostalih proupalnih citokina poput IL-1 β , TNF- α te faktora stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (31).

Demencija je sindrom kojeg karakterizira gubitak intelektualnih sposobnosti poput pamćenja, razmišljanja i prosuđivanja. Iako se uglavnom javlja u starijoj životnoj dobi, ne smatra se normalnim dijelom procesa starenja. Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) najčešći je oblik demencije, prisutan u gotovo 70 % slučajeva (32). Brojna istraživanja zabilježila su povoljne učinke oleokantala u ključnim molekularnim procesima koji doprinose patogenezi AD, kao što su formiranje i nakupljanje amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova. Kao krajnji rezultat tih procesa, dolazi do razvoja lokalnih upalnih reakcija te smanjenja broja neurona i sinapsi, tj. cerebralne atrofije (33). *In vitro* ispitivanja predlažu nekoliko mogućih mehanizama kovalentnih interakcija aldehidnih skupina oleokantala i ϵ -amino skupina lizina tau proteina prisutnih u neuronima. Na taj način oleokantal onemogućava tau-tau interakcije i posljedično formiranje neurofibrilarnih čvorova (34, 35). Povećavanjem imunoreaktivnosti, a time i eliminacije topljivih oligomernih oblika β amiloidnog peptida (engl. *amyloid-derived diffusible ligands*, ADDL), oleokantal umanjuje njihov toksičan učinak na neurone (36). Kao dodatan mehanizam povećanja eliminacije ADDL-a, utvrđen na staničnim i životinjskim modelima, navodi se povećanje ekspresije P-glikoproteina i proteina sličnog LDL receptoru 1 (engl. *LDL receptor related protein 1*, LRP1), transportnih proteina prisutnih na krvno moždanoj barijeri (37). Istraživanja objavljena ove godine opisuju novootkrivenu ulogu oleokantala u smanjenju disfunkcije mitohondrija koja u velikoj mjeri doprinosi procesu starenja i razvoju AD (38).

Opisano je nekoliko potencijalnih mehanizama na temelju kojih oleokantal ispoljava svoj protutumorski učinak. Pretjerana ekspresija protoonkogenog c-Met koji kodira za receptor hepatocitnog faktora rasta (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF) zabilježena je u određenim vrstama tumora. Vežanjem na receptor, HGF stimulira angiogenezu, preživljavanje, rast i širenje tumora. Primijećeni su antiproliferacijski, proapoptotski i antimigratorni učinci oleokantala na staničnim linijama tumora prostate (39), dojke (39, 40) i pluća (41) s pretjerano aktivnim HGF/c-Met signalnim putem, kao i *in vivo* učinci na životinjskim modelima tumora dojke i pluća (40, 41).

Kod većine danas dostupnih protutumorskih lijekova prisutan je velik broj štetnih i neželjenih reakcija koje se javljaju kao posljedica njihove neselektivnosti, tj. toksičnosti na netumorskim stanicama. Kao novi pristup tome problemu, navodi se mogućnost kombinacije već registriranih protutumorskih lijekova s polifenolima, poglavito onih prisutnih u maslinovom ulju (42). Zamijećen je *in vitro* i *in vivo* sinergistički učinak oleokantala i tamoksifena (43), selektivnog modulatora estrogenskih receptora, kao i oleokantala i lapatiniba

(44), dvojnog inhibitora receptora epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) i receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2). Na taj način, moguće je primijeniti manje doze lijekova, smanjujući mogućnost razvoja potencijalnih nuspojava. Uz to, primijećeno je kako oleokantal uzrokuje smanjenje broja estrogenskih receptora što dodatno doprinosi ideji njegove potencijalne upotrebe u terapiji hormonski ovisnih tumora dojke (43).

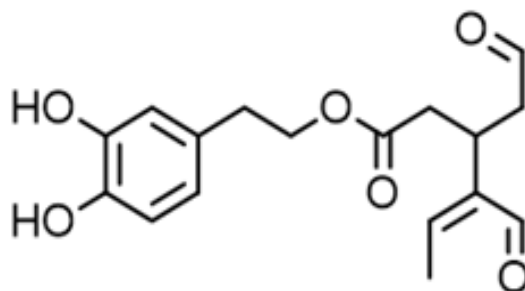
Ostala istraživanja ukazuju na njegovo antiproliferativno djelovanje na stanice hepatocelularnog karcinoma onemogućavanjem aktivacije transkripcijskog faktora STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) (45). Sličan mehanizam djelovanja utvrđen je prilikom proučavanja njegovog učinka na stanicama melanoma gdje je nakon inhibicije STAT3 primijećena smanjena ekspresija gena zaslužnih za angiogenezu i širenje tumora (46). Zanimljivo je napomenuti kako na netumorskim stanicama kožnih fibroblasta nije zabilježen toksičan učinak oleokantala, već se pokazalo kako posjeduje selektivno citotoksično djelovanje usmjereno isključivo prema ljudskim tumorskim stanicama melanoma (47). Lizosomalne membrane tumorskih stanica manje su stabilne nego one u normalnim stanicama, a selektivno protutumorsko djelovanje oleokantala može se djelomično objasniti njegovom ulogom u destabilizaciji lizosomalnih membrana tumorskih stanica povećavanjem njihove permeabilnosti što u konačnici dovodi do apoptoze ili nekroze tumorskih stanica (48). Uz sve navedeno, oleokantal pokazuje ohrabrujuće rezultate i u terapiji kolorektalnog karcinoma (49) te multiplog mijeloma (50).

1.2.2.2. Oleacein

Oleacein (Slika 3) jedan je od najzastupljenijih fenolnih spojeva maslinovog ulja (51). Prvi put je izoliran sredinom 90-ih godina, iz vodenog ekstrakta lišća maslina *Olea europaea* i *Olea lancea*. *In vitro* ispitivanja pokazala su kako oleacein snažno inhibira angiotenzin konvertirajući enzim (engl. *angiotensin converting enzyme*, ACE). Na temelju otkrivenog djelovanja, novoizolirani spoj nazvan je oleacein (*Olea*, ACE, inhibitor) (52).

ACE katalizira nastanak angiotenzina II, endogenog vazokonstriktora koji potiče stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Oksidativni stres usko je povezan s razvojem ateroskleroze i oštećenjem endotelnih progenitornih stanica (EPS) zaslužnih za obnavljanje krvnih žila i neovaskularizaciju ishemičnog tkiva. Protektivni učinak oleaceina na funkciju EPS-a očituje se u smanjenju produkcije ROS-a te poticanju proliferacije

i migracije EPS-a, povećavajući tako njihov angiogenetski potencijal (51). Zahvaljujući svojem iznimno potentnom antioksidativnom djelovanju (53), oleacein pridonosi smanjenju oksidacije LDL-a (54), a zabilježeno je i kako umanjuje mogućnost destabilizacije i rupture aterosklerotskih plakova, stoga bi se mogao pokazati iznimno korisnim u smanjenju rizika nastanka srčanog udara (55).



Slika 3. Oleacein.

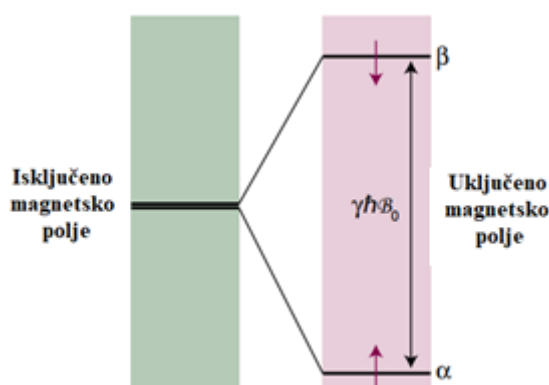
Po svojem protuupalnom učinku uspoređuje se s indometacinom (53), a daljnja ispitivanja utvrdila su kako inhibira 5-lipooksigenazu, ključan enzim u biosintetskom putu leukotriena, važnih proupalnih posrednika (56). Ispitano je i djelovanje oleaceina na imunosne stanice te se pokazalo kako zajedno s kompleksom haptoglobina i hemoglobina uzrokuje povećanu ekspresiju CD163 i IL-10 receptora na makrofagima. Takvi rezultati upućuju na mogući imunomodulatorni učinak oleaceina, promjenom M1 proupalnog fenotipa makrofaga u M2 protuupalni fenotip (57).

Upalni procesi adipoznog tkiva uključeni su u razvoj nekoliko kroničnih bolesti povezanih s prekomjernom tjelesnom masom. Oleacein i oleokantal sprječavaju aktivaciju transkripcijskog faktora NF- κ B u adipocitima i posljedičnu ekspresiju proupalnih gena (58). *In vivo* ispitivanja na miševima otkrila su protektivne učinke oleaceina na metaboličke promjene uzrokovane prehranom s visokim udjelom masti. Primijećeno je utišavanje upalnog odgovora smanjenjem prodora makrofaga i limfocita u adipoznom tkivu (59) te smanjenje nakupljanja abdominalnog masnog tkiva. Laboratorijski nalazi i histološka analiza jetre upućuju na preventivan učinak oleaceina na razvoj masne jetre i inzulinske rezistencije (60).

Nedavno objavljena istraživanja upućuju i na povoljnu ulogu oleaceina u tumorskim oboljenjima. Oleacein pokazuje slična protutumorska svojstva kao oleokantal, utvrđena na ne-melanomskim tumorima kože (61) kao i *in vitro* modelu humanog multiplog mijeloma (62).

1.3. NMR spektroskopija

Nuklearna magnetska rezonanca (NMR) spektroskopska je metoda koja se temelji na mjerenju rezonantne apsorpcije radiofrekvencijskog zračenja od strane jezgara smještenih u jakom magnetskom polju. Ovisno o broju protona i neutrona, spinski kvantni broj jezgre (I) može biti veći ili jednak nuli. NMR spektroskopijom mogu se proučavati jezgre atoma sa $I > 0$, tj. one koje imaju stalan nuklearni magnetski moment (63), kao što su: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P (64). Magnetski moment μ vektorska je veličina koja opisuje iznos i smjer magnetskog momenta jezgre. Jezgra atoma u prostoru može zauzeti $2I + 1$ različitih orijentacija magnetskog momenta prema proizvoljnoj osi (65, 66). Bez primjene vanjskog magnetskog polja, orijentacija magnetskog momenta jezgri atoma nasumična je te su sve orijentacije jednake energije. Ako se ^1H jezgra ($I = 1/2$) stavi u vanjsko magnetsko polje, ona može zauzeti dvije moguće orijentacije – u smjeru ili suprotno od smjera primijenjenog magnetskog polja (Slika 4) (66). 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) (63, 64, 66).



Slika 4. Shematski prikaz energetske razine spinskih stanja jezgre čiji je $I = 1/2$. Prilagođeno iz (65).

Dovođenjem elektromagnetskog zračenja (EMZ) odgovarajuće frekvencije, moguće je potaknuti prijelaze između nižeg α stanja i višeg β stanja. Do takvog prijelaza dolazi kada je energija primijenjenog EMZ jednaka razlici energija tih dvaju spinskih stanja, tj. u slučaju kada je frekvencija EMZ jednaka tzv. Larmorovoj frekvenciji ν_L koja je dana jednadžbom:

$$\nu_L = \frac{\gamma_N B_0}{2\pi}$$

gdje je γ_N magnetožirni omjer jezgre, a B_0 primijenjeno vanjsko magnetsko polje u smjeru osi z (65, 66).

Za razliku od starijih NMR spektrometara u kojima je uzorak izložen promjenjivom vanjskom magnetskom polju i EMZ konstantne frekvencije, moderni NMR uređaji temelje se na pulsnoj tehnici pobuđivanja. Ispitivanom uzorku smještenom u magnetskom polju konstantne jakosti dovodi se puls ili niz pulseva promjenjive frekvencije. Konačno, postupkom Fourierove transformacije, dobivena ovisnost intenziteta signala o vremenu (engl. *free induction decay*, FID) prevodi se u ovisnost intenziteta signala o frekvenciji, tj. u spektar (64, 66).

1.3.1. Kvantitativna ^1H NMR analiza maslinovog ulja

^1H NMR spektroskopija najčešće je korištena NMR tehnika te se smatra nezaobilaznom komponentom suvremenih istraživanja zbog svoje iznimne sposobnosti identifikacije i jednoznačnog utvrđivanja trodimenzionalne molekulske strukture različitih spojeva. Površine signala u ^1H NMR spektrima proporcionalne su broju ekvivalentnih protona, stoga se navedena metoda, pored kvalitativnih, može koristiti i za kvantitativne analize (64). Kako je riječ o vrlo robusnoj metodi koja pruža mogućnost kvantitativne analize složenih smjesa u jako kratkom vremenu, ^1H NMR spektroskopija prepoznata je kao jedna od metoda izbora analize sadržaja maslinovih ulja (67, 68).

Određivanje sadržaja masnih kiselina široko je rasprostranjena analiza korištena za utvrđivanje kvalitete (69) te provjere čistoće i autentičnosti maslinovih ulja (70, 71). Pored toga, upotrebljava se za potrebe geografske klasifikacije maslinovih ulja te praćenja utjecaja klimatskih i drugih faktora na njihov sadržaj (72, 73). U tu svrhu, Ok. et al razvili su brzu i jednostavnu kvantitativnu ^1H NMR metodu određivanja udjela masnih kiselina koja omogućava analizu velikog broja maslinovih ulja u vrlo kratkom vremenskom roku (74).

Opće je prihvaćena i upotreba ^1H NMR spektroskopije u svrhu kvantitativne analize polarne, manjinske frakcije maslinovih ulja određivanjem sadržaja flavonoida, sekoiridoida, lignana te fenolnih kiselina i alkohola. Prednost ove metode očituje se u tome što prethodna derivatizacija spojeva, kao i upotreba standarada, nisu nužno potrebne (67). Prije nekoliko godina, razvijena je nova metoda direktnog određivanja sekoiridoida oleokantala i oleaceina (75) koja je dosad zabilježila višestruke primjene. Osim što je doprinijela karakterizaciji fenolnog profila velikog broja različitih maslinovih ulja (76–81), korištena je u sklopu istraživanja biološkog potencijala spomenutih spojeva (82–84). Upravo su pouzdanost ovakve analize, kao i njezina jednostavnost, odlučujući čimbenici koji predstavljaju plodno tlo daljnjem razvoju novih i unaprjeđenju postojećih ^1H NMR metoda analize maslinovih ulja.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Maslinovo ulje, kao jedna od neizostavnih sastavnica mediteranske prehrane, zahvaljujući svojem povoljnom sastavu masnih kiselina i biološki aktivnih fenolnih spojeva, povezuje se s velikim brojem pozitivnih učinaka na zdravlje (10). U današnje vrijeme osobito se cijeni tzv. „maslinovo ulje bogato fenolima“ s fenolnim sadržajem većim od 250 mg/kg, koje prema EU regulativi (432/2012) može nositi oznaku zdravstvene tvrdnje (engl. *health claim*) (85). Posebno su značajni oni fenolni spojevi specifični za maslinovo ulje poput oleokantala i oleaceina čiji se biološki učinci posljednjih godina opsežno istražuju te bilježe značajan porast u broju znanstvenih publikacija. Oleokantal, poznat kao prirodni nesteroidni protuupalni lijek s COX-1 i COX-2 inhibitornim učinkom usporedivim s ibuprofenom (27), ističe se svojim antireumatskim (30, 31, 34), antitumorskim (39-50) i neuroprotektivnim (33-38) učincima. S druge strane, oleacein je prepoznat kao molekula iznimnih kardioprotektivnih (51, 55), protuupalnih (53, 56-58) i antitumorskih (61, 62) svojstava. Maslinovo ulje glavni je izvor masti u mediteranskoj prehrani, a među masnim kiselinama, u najvećoj mjeri zastupljena je oleinska kiselina čiju se redovitu konzumaciju povezuje sa smanjenim rizikom nastanka koronarne bolesti srca (23). Od ostalih masnih kiselina ističu se esencijalne masne kiseline poput linolne kiseline, važnog prekursora brojnih lipidnih medijatora (86), te α -linolenska kiselina koja igra ključnu ulogu u prevenciji dijabetesa, pretilosti i kardiovaskularnih bolesti (87). Uzimajući u obzir sve navedene pozitivne učinke, mogućnost prepoznavanja sorti masline i maslinovih ulja koja su posebno bogata navedenim fenolnim spojevima od značajne je važnosti.

NMR spektroskopija izuzetno je prikladna metoda za kvantitativnu analizu složenih smjesa poput maslinovog ulja (67). Nedavno je razvijena brza i pouzdana kvantitativna NMR metoda za određivanje sadržaja oleokantala i oleaceina (75) primjenom koje je karakteriziran velik broj maslinovih ulja (76-79, 82-84). Međutim, sadržaj oleokantala i oleaceina u maslinovom ulju hrvatskih sorti masline vrlo je oskudno ispitan (80, 81).

Cilj ovog istraživanja je odrediti sadržaj oleokantala i oleaceina te oleuropein i ligstrozid aglikona i sastav masnih kiselina u maslinovom ulju probranih autohtonih hrvatskih sorti masline, pri čemu će se dobiti uvid o potencijalu hrvatskih maslinovih ulja kao vrijednom izvoru ovih biološki aktivnih spojeva. U tu svrhu primijenit će se kvantitativna ^1H NMR metoda određivanja oleokantala i oleaceina te oleuropein i ligstrozid aglikona (75, 76). Potrebno je izraditi baždarne pravce za određivanje koncentracije oleokantala i oleaceina, optimirati i validirati korištenu metodu, izolirati fenolne spojeve iz maslinovog ulja te analizirati dobivene

fenolne ekstrakte maslinovih ulja. Uz to, primijenit će se i kvantitativna ^1H NMR metoda za određivanje udjela masnih kiselina u maslinovom ulju (74).

U sklopu daljnjeg istraživanja planira se ispitati biološka aktivnost fenolnih ekstrakata maslinovih ulja te povezanost utvrđene aktivnosti sa sadržajem oleokantala i oleaceina u njima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Acetonitril (za HPLC) i cikloheksan (*p.a*) nabavljeni su od tvrtke Merck (Njemačka), siringaldehid (*p.a.*) i deuterirani kloroform (99,8 % D atoma) pribavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), dok su standardi oleaceina (*p.a.*) i oleokantala (*p.a.*) nabavljeni od PhytoLab GmbH & Co. KG (Njemačka).

3.1.2. Uzorci maslinovog ulja

Ispitan je sastav sedam maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline dobivenih u okviru suradnje s Agronomskim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu: Bjelica (Istra), Buža (Istra), Žizolera (Istra, Oleum Maris), Žizolera (Istra, Meloto), Oblica (Ugljan), Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Ulja su pripravljena na centrifugalnoj mini liniji. Maslinovo ulje sorte Oblica-slano pripravljeno je od istih plodova kao uzorak Oblica (Ugljan) tako što je plod masline nakon berbe skladišten u morskoj vodi prije samog procesa prerade u ulje. Za svrhu izrade baždarnih pravaca, komercijalno su pribavljene tri vrste maslinovog ulja, *Zvijezda*, *Despar* i *Trenton*. Tijekom skladištenja uzorci su čuvani u tamnim bocama pri temperaturi od 4 °C.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju

3.2.1.1. Ekstrakcija sekoiridoidnih fenolnih spojeva iz maslinovog ulja

Ekstrakcija se izvodi dodatkom 25 mL acetonitrila i 20 mL cikloheksana u $(5,00 \pm 0,01)$ g maslinovog ulja, prema ranije opisanom postupku (76). Smjesa ulja i ekstrakcijskih otapala miješa se uz pomoć vortex miješalice jednu minutu, pri čemu dolazi do odjeljivanja fenolnih spojeva u acetonitrilni sloj. Nakon toga, smjesa se centrifugira 5 minuta uz 4000 okretaja po minuti (Hettich centrifuge D-78532, Tuttlingen, Njemačka). Odvoji se acetonitrilna frakcija te joj se doda 1,0 mL otopine internog standarda, otopina siringaldehida koncentracije 0,5 mg/mL. Acetonitrilna frakcija zatim se upari do suha uz pomoć vakuumskog uparivača (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) pri temperaturi ne većoj od 33 °C. Tijekom cijelog

postupka, uzorak se minimalno izlagao svjetlosti i kisiku. Do NMR analize, suhi ostatak čuvan je pri temperaturi od -8 °C.

Metanol i voda često su korištena ekstrakcijska otapala polifenolnih spojeva, no problematičnost njihove upotrebe očituje se u zapaženoj kemijskoj nestabilnosti analiziranih sekoiridoidnih fenolnih spojeva oleokantala i oleaceina te oleuropein i ligstrozid aglikona. Zamijećeno je formiranje poluacetalnih i acetalnih derivata oleokantala i oleaceina, kao i izomerizacija navedenih aglikona, stoga se acetonitril ističe kao ekstrakcijsko otapalo izbora (75, 76).

3.2.1.2. Priprema otopine internog standarda

Otopina internog standardna koncentracije 0,5 mg/mL priređena je u odmjerne tikvici od 50,0 mL vaganjem 0,02542 g siringaldehida (4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid) i otapanjem u acetonitrilu. Stabilnost otopine kontrolirana je UV-Vis spektrofotometrijom. Otopina je čuvana pri temperaturi od -8 °C uz minimalno izlaganje svjetlosti i kisiku.

3.2.1.3. Kvantitativna ¹H NMR spektroskopija fenolnog ekstrakta maslinovog ulja

Suhi ostatci dobiveni ekstrakcijom otopljeni su u 750 µL deuteriranog kloroforma, CDCl₃, a 550 µL zatim je preneseno u 5 mm NMR tubu. ¹H NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker Avance 600 (14,1 T) (Institut Ruđer Bošković, Centar za NMR), pri temperaturi od 25 °C, prema ranije opisanom postupku uz određene izmjene (76). Spektri su snimljeni pri frekvenciji od 600,130 MHz. Za snimanje ¹H NMR spektara, korištena je spektralna širina od 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 odgođe od 5,0 s, 64 pulsa po spektru i pulsni kut 90°. Dobiveni ¹H NMR spektri koriste se za kvantitativno određivanje oleokantala i oleaceina te polu-kvantitativno određivanje oleuropein i ligstrozid aglikona. Spektri su obrađeni uz primjenu *TopSpin* programa (*TopSpin* 4.0.7., Bruker), uz ručno integriranje odgovarajućih signala.

3.2.1.4. Izrada baždarnih pravaca za određivanje oleokantala i oleaceina

Uzorci maslinovog ulja koji su korišteni za izradu baždarnih pravaca pripremljeni su tako što je u $(5,00 \pm 0,01)$ g maslinovog ulja *Trenton* dodan određeni volumen otopina standarda oleokantala ili oleaceina kako bi se pripremio niz uzoraka ulja u kojima je koncentracija oleokantala i oleaceina u rasponu od 10,0 do 350 mg/kg ulja (Tablica 1). Zatim je provedena ekstrakcija fenolnih spojeva iz ovih uzoraka ulja na način opisan u poglavlju 3.2.1.1.

Tablica 1. Priprava uzoraka ulja za izradu baždarnih pravaca

volumen (V) otopina standarda oleokantala (μL) dodan u <i>Trenton</i> ulje	koncentracija (c) oleokantala u <i>Trenton</i> ulju (mg/kg)*	volumen (V) otopina standarda oleaceina (μL) dodan u <i>Trenton</i> ulje	koncentracija (c) oleaceina u <i>Trenton</i> ulju (mg/kg)**
100,0	10,94	120,0	10,02
400,0	43,76	240,0	20,04
800,0	87,52	400,0	40,96
1100	118,6	960,0	80,16
1600	172,5	1200	122,9
1600	175,0	1600	163,8
2400	258,7	2880	240,5
3200	345,0	3840	320,6

$$* \text{ Coleokantal u ulju (mg/kg)} = \frac{C_{\text{otopina oleokantala (mg/mL)}} \cdot V_{\text{oleokantal (mL)}} \cdot 1000}{5}$$

$$** \text{ Coleacein u ulju (mg/kg)} = \frac{C_{\text{otopina oleaceina (mg/mL)}} \cdot V_{\text{oleacein (mL)}} \cdot 1000}{5}$$

Snimljeni su spektri dobivenih ekstrakata, na način opisan u poglavlju 3.2.1.3.. Integriran je signal internog standarda (P_{IS}) i signali oleokantala ($P_{\text{oleokantal}}$) i oleaceina (P_{oleacein}). Izračunan je omjer površine signala oleokantala i oleaceina i površine signala internog standarda ($P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$, $P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$). Na baždarnom pravcu prikazana je ovisnost $P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$ o koncentraciji oleokantala u uzorku maslinovog ulja, kao i ovisnost $P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$ o koncentraciji oleaceina u uzorku maslinovog ulja.

3.2.1.4.1. Priprema otopina standarda oleokantala i oleaceina

Za pripremu otopina oleokantala i oleaceina koncentracije $\sim 0,5$ mg/mL, korišteni su komercijalno dostupni standardi. Na bočicama s ~ 5 mg standarda naznačena je točna masa na dvije decimale (tri značajne znamenke). S obzirom na to da su navedeni standardi viskozne tekućine koje je teško izravno prenositi, u bočicu sa standardom postupno je dodavan acetonitril te se sadržaj kvantitativno prenio u odmjernu tikvicu od 10,0 mL. Kvantitativnost postupka pripreme i stabilnost otopina kontrolirana je UV-VIS spektrofotometrijom (Prilozi 17 i 18). Pripravljene su dvije otopine standarda oleokantala i dvije otopine standarda oleaceina, koncentracija 0,547 mg/mL, 0,539 mg/mL, 0,512 mg/mL i 0,418 mg/mL, redom.

3.2.1.5. Validacija metode

Validacija metode provedena je ispitivanjem sljedećih validacijskih parametara: selektivnost, preciznost, linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja (88).

Preciznost analitičke metode ispitana je usporedbom ponovljenih mjerenja koncentracija oleokantala i oleaceina u istom uzorku maslinovog ulja, pri istim propisanim uvjetima. Prikazana je kao ponovljivost (engl. *intra-day repeatability*), usporedbom ponovljenih mjerenja istog uzorka u istom danu, te kao srednja preciznost (engl. *intermediate precision*), usporedbom mjerenja istog uzorka tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Izražena je kao relativna standardna devijacija (engl. *relative standard deviation*, RSD), tj. omjerom standardnog odstupanja (engl. *standard deviation*, SD) i srednje vrijednosti.

Linearnost analitičke metode ispitana je na osam koncentracijskih razina standarda oleokantala i oleaceina u uzorcima ulja, čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.1.4.. Linearni regresijski pravci konstruirani su na temelju provedenih mjerenja i dobivenih rezultata (poglavlje 3.2.1.4.). Linearnost je izražena koeficijentom korelacije regresijskog pravca (r) te su određena standardna odstupanja nagiba (s_a) i odsječka pravca (s_b).

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) određene su pojedinačno za oleokantal i oleacein, na sljedeći način

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot s_b}{a} \quad \text{i} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_b}{a}$$

gdje je s_b standardno odstupanje odsječka pravca, dok je a nagib pravca.

3.2.2. Određivanje udjela masnih kiselina u maslinovom ulju

3.2.2.1. Polu-kvantitativna ^1H NMR spektroskopija maslinovog ulja

Provedena je polu-kvantitativna ^1H NMR analiza zastupljenosti pojedinih masnih kiselina u maslinovim uljima, tj. određen je njihov udio u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina, prema ranije opisanom postupku (70, 74). U 5 mm NMR tubu prenese se 150 μL ispitivanog maslinovog ulja i 600 μL deuteriranog kloroforma te se sadržaj promiješa.

^1H NMR spektri snimani su na dva instrumenta. Spektri snimljeni na instrumentu Bruker Avance 600 (14,1 T) (Institut Ruđer Bošković, Centar za NMR) snimljeni su pri frekvenciji od 600,130 MHz i temperaturi od 25 °C. Za snimanje ^1H NMR spektara korištena je spektralna širina od 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. Spektri snimljeni na instrumentu Varian Inova 400 (9,4 T) (Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko biokemijski fakultet) snimljeni su pri frekvenciji od 399,59 MHz i temperaturi od 25 °C. Za snimanje ^1H NMR spektara korištena je spektralna širina od 0-16 ppm (6400 Hz), s prikupljanjem 32 800 podataka i vremenom akvizicije od 2,56 s. Digitalno razlučivanje iznosi 0,4 Hz po točki. U oba slučaja korišteno je relaksacijsko vrijeme odgode od 5,0 s, 64 pulsa po spektru te pulsni kut 90°. Spektri su obrađeni uz primjenu *TopSpin* programa (*TopSpin* 4.0.7., Bruker), uz ručno integriranje odgovarajućih signala.

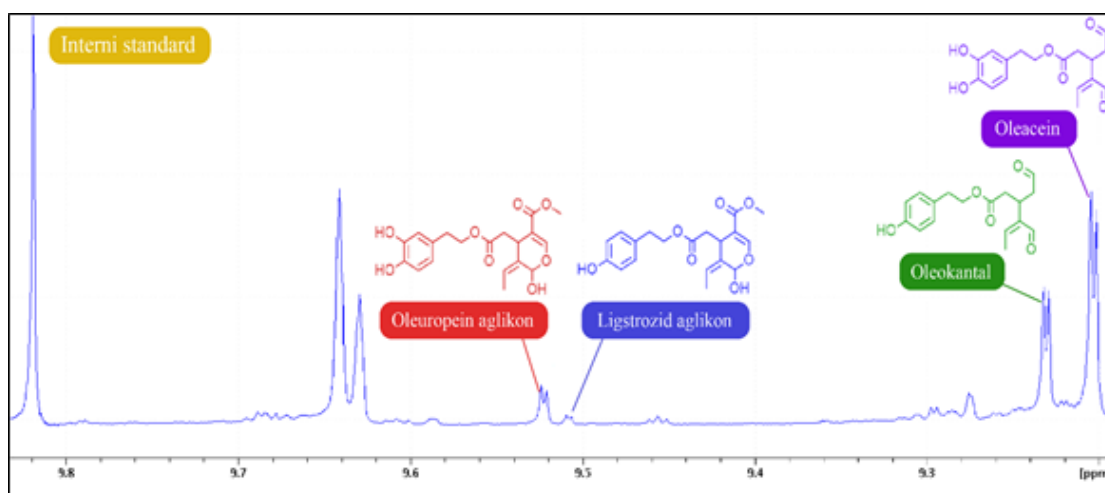
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline

Ispitan je sastav maslinovih ulja 7 autohtonih hrvatskih sorti masline, Bjelica (Istra), Buža (Istra), Žižolera (Istra, Oleum Maris), Žižolera (Istra, Meloto), Oblica (Ugljan), Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Provedena je kvantitativna ^1H NMR analiza sadržaja oleokantala i oleaceina te polu-kvantitativna analiza oleuropein i ligstrozid aglikona. Njihovoj kvantifikaciji prethodila je ekstrakcija fenolnih spojeva opisana u poglavlju 3.2.1.1..

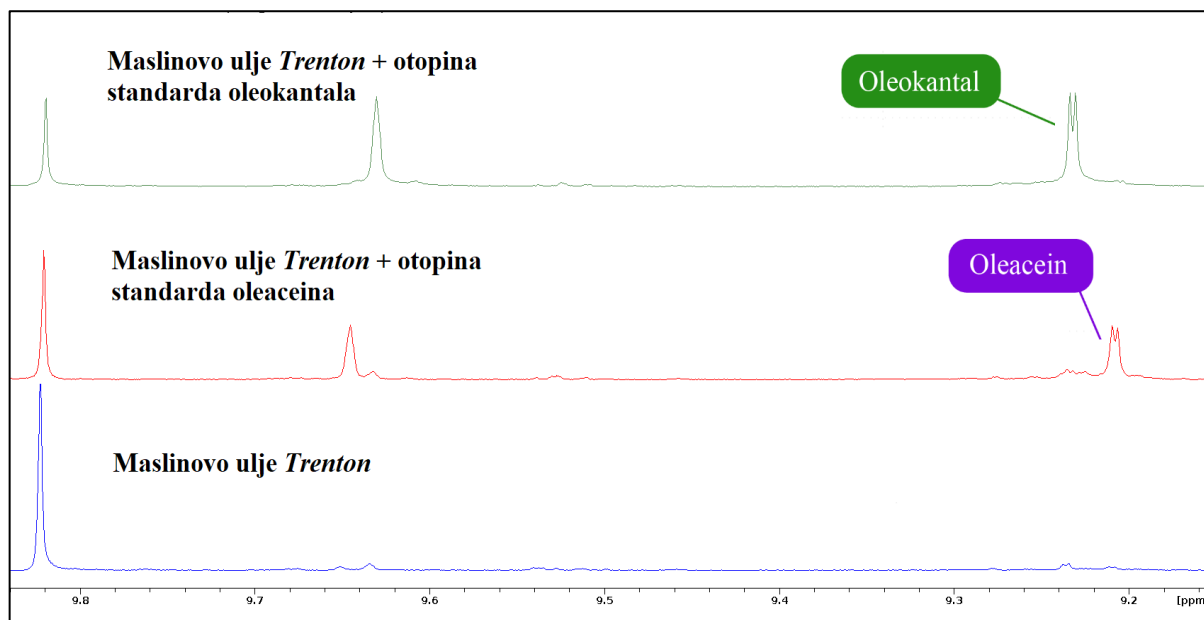
4.1.1. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja

^1H NMR spektri fenolnih ekstrakata maslinovog ulja u deuteriranom kloroformu, između 9,10 i 9,83 ppm prikazuju niz signala koji odgovaraju aldehidnim protonima analiziranih sekoiridoidnih fenolnih spojeva (Slika 5). 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 standarda ($P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$) te oleokantala i internog standarda ($P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$). Integrirani su i dubleti aglikona oleuropeina na 9,53 ppm i aglikona ligstrozida na 9,51 ppm te su izračunani omjeri njihovih površina i površine internog standarda ($P_{\text{oleuropein aglikon}}/P_{\text{IS}}$, $P_{\text{ligstrozid aglikon}}/P_{\text{IS}}$).



Slika 5. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Oblica (Ugljan). Prikaz pripadajućih signala sekoiridoidnih fenolnih spojeva.

Navedeni spojevi identificirani su prema literaturi (76), a njihov položaj u spektru dodatno je potvrđen dodatkom otopina standarada oleokantala i oleaceina u maslinovo ulje *Trenton*, prilikom izrade baždarnih pravaca (Slika 6).



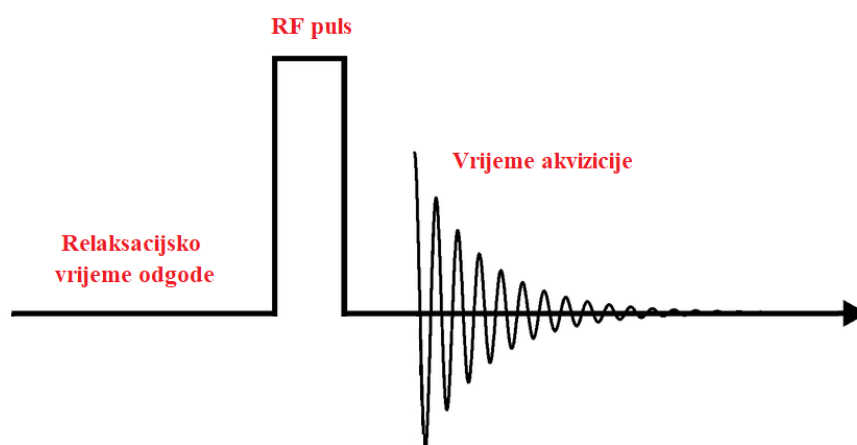
Slika 6. ^1H NMR spektar maslinovog ulja *Trenton* prije i poslje dodatka otopina standarada oleokantala i oleaceina.

4.1.2. Optimizacija postavki snimanja i obrade ^1H NMR spektara

Određene su najpovoljnije postavke snimanja i obrade spektara ispitivanjem sljedećih parametara: relaksacijsko vrijeme odgode, pulsni kut (θ), vrijeme akvizicije, zaključavanje faze (engl. *lock phase*), broj pulseva po spektru, širenje spektralnih linija te način integriranja signala. Preliminarna mjerenja provedena su na 400 MHz NMR instrumentu zbog ograničene dostupnosti mjerenja na 600 MHz instrumentu.

Optimiziranje relaksacijskog vremena odgode, vremena akvizicije, kao i pulsno g kuta tijekom snimanja NMR spektara od ključne je važnosti za postizanje ispravne i pouzdane integracije signala. Ukoliko se koristi prekratko relaksacijsko vrijeme odgode (engl. *relaxation delay*), tj. ako se novi puls radiofrekvencijskog zračenja (RF puls) primjeni prije nego dođe do potpune relaksacije jezgri protona, doći će do smanjenja intenziteta signala ili čak do njegovog potpunog izostanka (89). Da bi došlo do potpunog prijelaza jezgara iz višeg spinskog stanja u niže, prije primjene sljedećeg pulsa potrebno je pričekati otprilike tri do pet puta dulje od

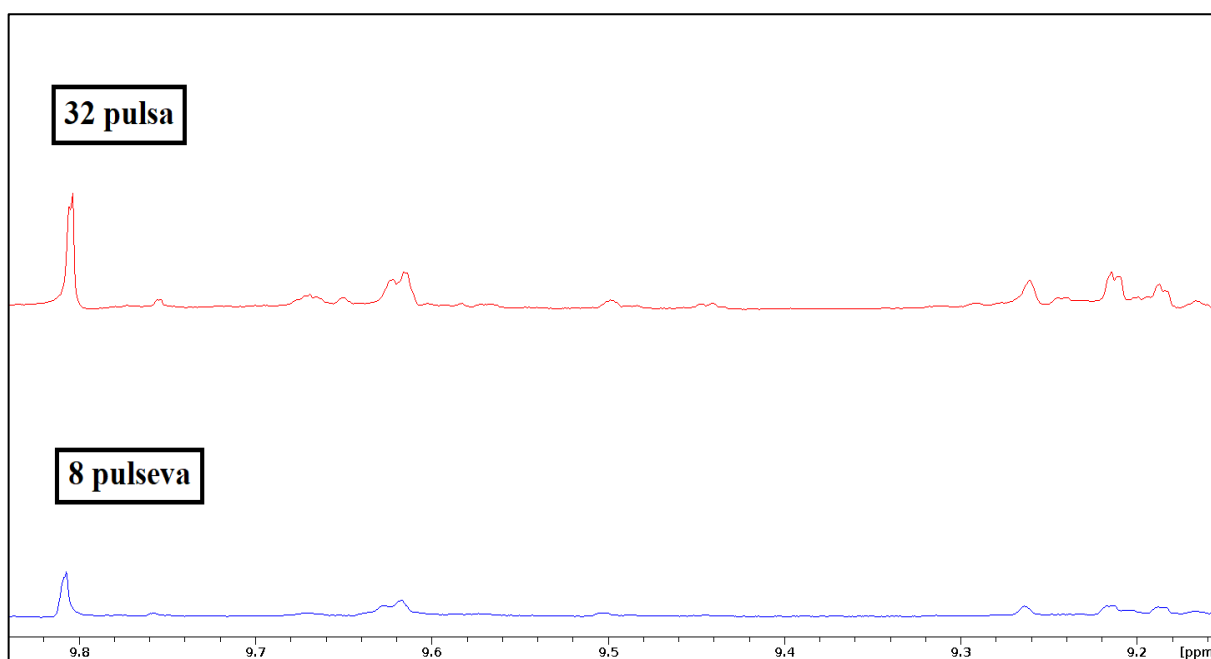
vremena longitudinalne relaksacije, T_1 (89, 90). Za fenolne ekstrakte maslinovog ulja uobičajeno se koristi relaksacijsko vrijeme od 1,0 s (75, 76), dok se u novijoj literaturi spominje vrijeme od 5,0 s (82). Ako nije poznato vrijeme T_1 , za ^1H jezgre preporučuje se vrijeme od 30,0 s (91). S obzirom na to da u ovom slučaju T_1 nije poznato, spektri su snimljeni s 4 različita relaksacijska vremena odgode: 1, 5, 10 i 25 s. Utvrđeno je kako je korištenje relaksacijskog vremena odgode od 10,0 i 25,0 s uveliko produžilo vrijeme snimanja, bez značajnog povećanja intenziteta signala u usporedbi s nižim vrijednostima. Iz tog razloga, uzimajući u obzir praktičnu primjenjivost ove analitičke metode, odlučeno je pobliže ispitati korištenje nižih vrijednosti relaksacijskog vremena odgode, kako bi vrijeme trajanja pojedinog snimanja bilo unutar prihvatljivih granica. Vrijeme relaksacije od 5,0 s pokazalo se optimalnim zbog prihvatljivih, vrlo niskih odstupanja u integraciji. Osjetljivost i točnost integriranja, pored relaksacijskog vremena odgode, ovise i o pulsnom kutu (89). Spektri su snimani koristeći dva različita pulsna kuta: 45 i 90 °. Manji pulsni kut skraćuje vrijeme trajanja snimanja (89), dok je pulsni kut od 90 ° u većoj mjeri doprinio poboljšanju osjetljivosti, te je iz tog razloga primijenjen u daljnjim snimanjima. Vrijeme akvizicije (engl. *acquisition time*) predstavlja vrijeme nakon primijenjenog RF pulsa tijekom kojeg se detektira signal. Za ^1H NMR spektre preporučuje se vrijeme od 1,0 do 5,0 s (92). Spektri su snimljeni s 3 različita vremena akvizicije: 1,36, 2,56 i 5,0 s. S obzirom na odabranu spektralnu širinu (0-20 ppm) i željeno digitalno razlučivanje (0,7 Hz) odabrano je vrijeme od 1,36 s. Shematski prikaz NMR pulsne sekvence prikazan je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz NMR pulsne sekvence. Prilagođeno iz (93).

Stabilnost magnetskog polja jedan je od presudnih faktora NMR spektroskopije. Tijekom duljeg vremenskog razdoblja dolazi do tzv. *drifta* magnetskog polja, tj. njegovog postupnog slabljenja. Bez valjanog sustava detekcije i korekcije, signali na spektru vremenom bi se pojavljivali na različitim frekvencijama što bi posljedično dovelo do širenja signala i smanjene rezolucije (66, 94, 95). Zaključavanje faze (engl. *lock phase*) jedan je od parametara koji doprinose stabilizaciji magnetskog polja. Spektri su snimljeni uz zaključavanje faze od 50 i 90 ° te se potonja vrijednost pokazala boljom.

Kako bi se postigla zadovoljavajuća osjetljivost metode, ispitan je utjecaj broja pulseva po spektru na omjer signala i šuma. ^1H NMR spektri snimljeni su s 8, 32, 64 i 128 pulsa po spektru te se pritom pratilo i trajanje mjerenja koje se znatno povećavalo s povećanjem broja pulseva. Dva spektra istog fenolnog ekstrakta maslinovog ulja snimljena s 8 i 32 pulsa po spektru prikazana su na Slici 8.

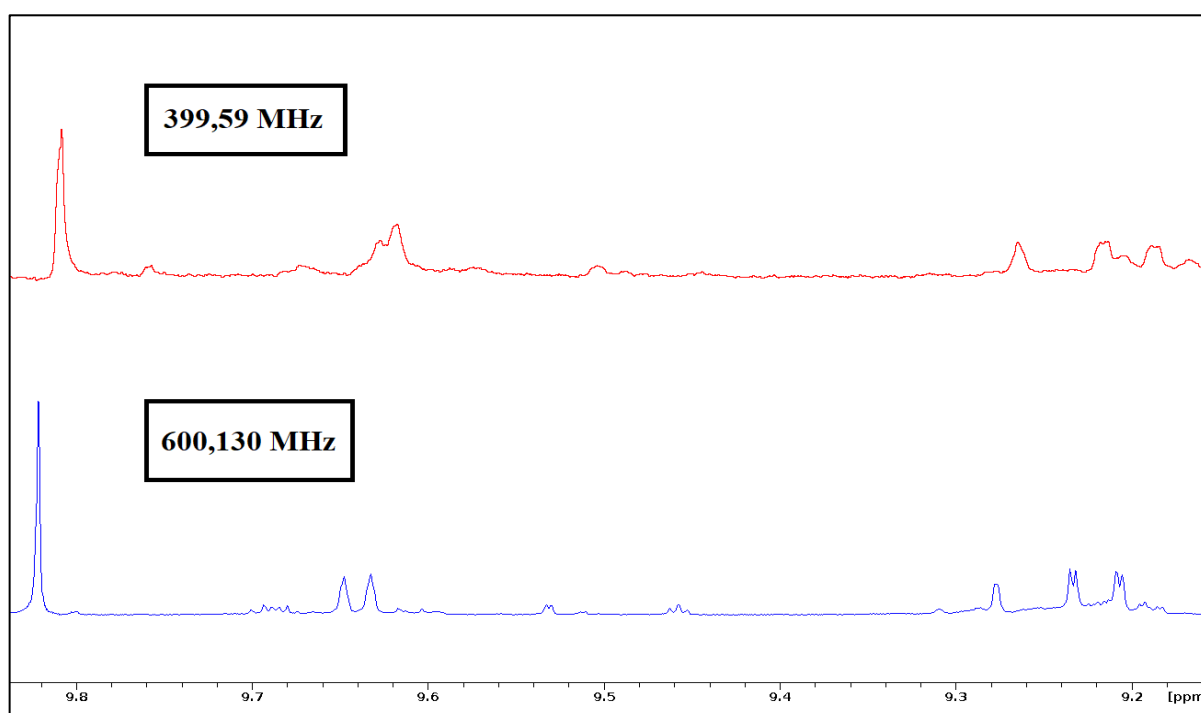


Slika 8. ^1H NMR spektri fenolnog ekstrakta maslinovog ulja snimljenog s 8 i 32 pulsa po spektru.

Visok omjer signala i šuma izrazito je važan za postizanje odgovarajuće preciznosti integracije prilikom kvantitativne analize. Jedan od načina na koji ga se može poboljšati jest povećavanjem broja korištenih pulseva po pojedinom spektru. Omjer signala i šuma

proporcionalan je drugom korijenu broja pulseva, tj. da bi ga se udvostručilo, potrebno je primijeniti četiri puta veći broj pulseva po spektru (89). Povećanje broja pulseva s 8 na 32 nije u dovoljnoj mjeri doprinijelo povećanju osjetljivosti (Slika 8), dok je usporedbom spektara snimljenih s 32 i 64 pulsa zabilježeno znatno poboljšanje u omjeru signala i šuma. Nije uočena značajna razlika između spektara snimljenih sa 64 i 128 pulsa po spektru, stoga je zbog smanjenja vremena trajanja postupka odlučeno koristiti 64 pulsa po spektru.

^1H NMR spektri snimljeni na dva različita NMR spektrometra, Bruker Avance 600 (14,1 T) pri frekvenciji od 600,130 MHz te Varian Inova 400 (9,4 T) pri frekvenciji od 399,59 MHz prikazani su na Slici 9.



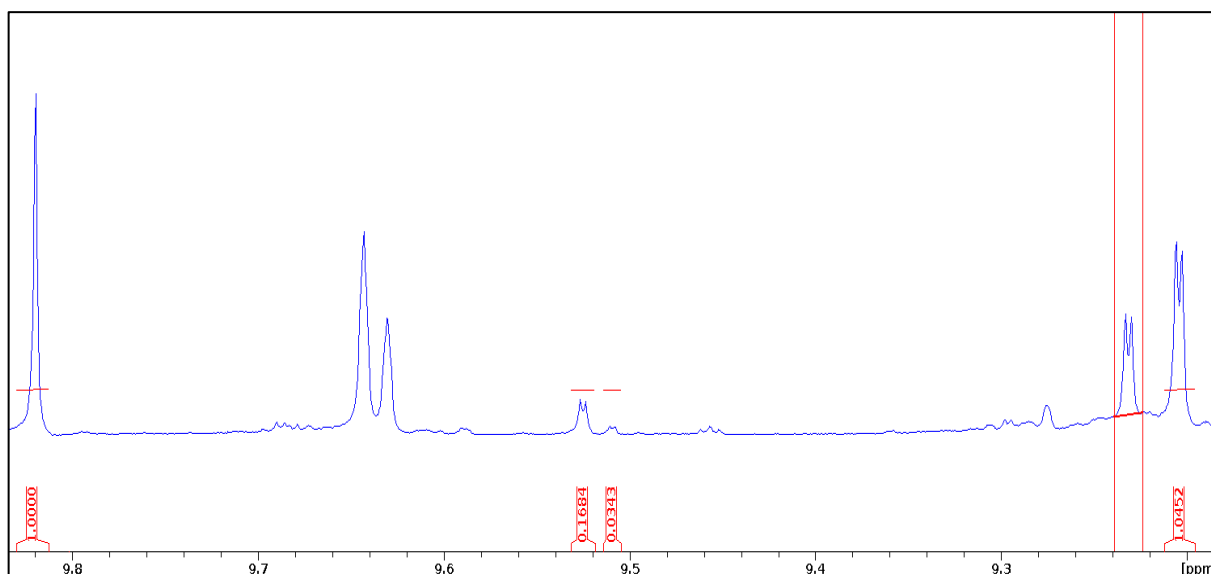
Slika 9. ^1H NMR spektri fenolnog ekstrakata maslinovog ulja sorte Buža, snimljeni na dva različita NMR spektrometra, pri frekvenciji od 399,59 MHz i 600,130 MHz.

Kako na 400 MHz NMR instrumentu nije postignuta zadovoljavajuća osjetljivost, bez obzira na korištene postavke mjerenja, odlučeno je spektre snimiti na NMR spektrometru jačeg magnetskog polja. Karkoula et al. (2014) ističu kako je snimanje uzoraka na 600 MHz instrumentu, umjesto na 400 MHz, uvelike doprinijelo smanjenju preklapanja određenih signala (76). U skladu s navedenim, na slici je vidljivo kako je na 600 MHz spektrometru postignut daleko bolji omjer signala i šuma kao i bolje razdvajanje signala te je iz tog razloga 600 MHz

instrument odabran za daljnje određivanje sadržaja ekstrakata svih uzoraka maslinovog ulja, kao i za mjerenja vezana za izradu baždarnih pravaca.

Od postavki obrade ^1H NMR spektara ispitana su dva načina ručnog integriranja signala, integracija signala sa i bez korekcije bazne linije, a u svrhu postizanja bolje osjetljivosti, na pojedinim spektrima primijenjeno je širenje spektralnih linija.

Ravna bazna linija iznimno je važna za točno i pouzdano određivanje sadržaja. Spektri integrirani bez korekcije bazne linije nisu pokazivali konzistentne rezultate, stoga je odlučeno prilikom integracije baznu liniju ručno korigirati za svaki pojedini signal (Slika 10). Širenje spektralnih linija preporučuje se kod spektara s malim omjerom signala i šuma. Za ^1H NMR spektre uobičajeno se koriste vrijednosti između 0,2 i 1,0 Hz. Smanjivanjem šuma povećava se osjetljivost metode, dok u isto vrijeme dolazi do širenja signala i smanjenja rezolucije, stoga je vrlo važno pronaći odgovarajuću ravnotežu (91, 96). Na 400 MHz NMR instrumentu ovim je načinom pokušano povećati osjetljivost ispitavši utjecaj širenja spektralnih linija od 0,3 i 1,5 Hz. Na 600 MHz instrumentu omjer signala i šuma već je bio zadovoljavajući, stoga širenje spektralnih linija nije bilo potrebno primijeniti u obradi daljnjih spektara.



Slika 10. Prikaz integracije signala u ^1H NMR spektru s korekcijom bazne linije.

Najpovoljniji parametri ^1H NMR snimanja utvrđeni su obradom ukupno 57 spektara. Postavke snimanja kod kojih je postignuta najveća osjetljivost i reproducibilnost rezultata, kao i najbolje razdvajanje signala prikazane su u Tablici 2.

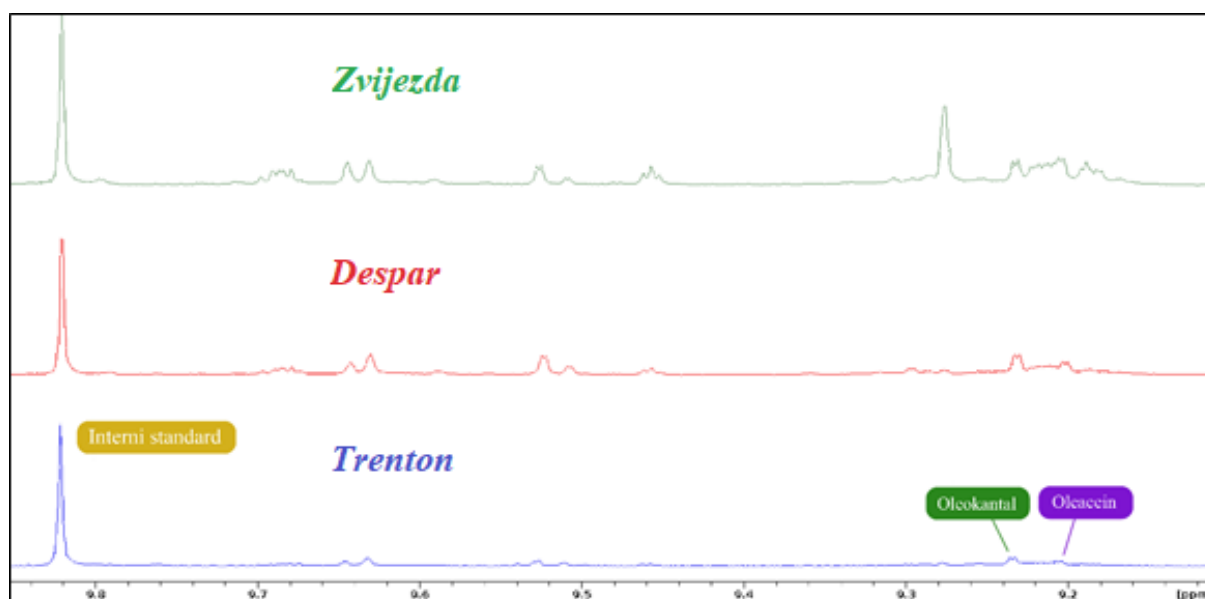
Tablica 2. Eksperimentalno utvrđene najpovoljnije postavke snimanja ^1H NMR spektara

Relaksacijsko vrijeme odgode / (s)	Broj pulseva	Vrijeme akvizicije / (s)	θ / ($^\circ$)	Zaključavanje faze / ($^\circ$)
5	64	1,36	90	90

4.1.3. Baždarni pravci za određivanje oleokantala i oleaceina

4.1.3.1. Odabir maslinovog ulja za izradu baždarnih pravaca

Snimljeni su ^1H NMR spektri tri komercijalno pribavljena maslinova ulja, *Zvijezda*, *Despar* i *Trenton* (Slika 11), za koje se pretpostavilo da bi mogli imati nizak sadržaj fenolnih spojeva. U njima je određen sadržaj oleokantala i oleaceina, a izražen je kao omjer površina odgovarajućih signala i internog standarda ($P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$, $P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$) (Tablica 3).



Slika 11. ^1H NMR spektri fenolnih ekstrakata tri maslinova ulja, *Zvijezda*, *Despar* i *Trenton*.

Tablica 3. Sadržaj sekoiridoidnih fenolnih spojeva oleokantala i oleaceina u komercijalno pribavljenim maslinovim uljima. Sadržaj je izražen kao omjer površina signala odgovarajućeg fenolnog spoja i internog standarda ($P_{oleokantal}/P_{IS}$, $P_{oleacein}/P_{IS}$) u 1H NMR spektru

Maslinova ulja različitih proizvođača	Sekoiridoidni fenolni spojevi ($P_{sek. fenol}/P_{IS}$)	
	Oleokantal	Oleacein
<i>Despar</i>	0,1812	0,0834
<i>Zvijezda</i>	0,1805	0,2112
<i>Trenton</i>	0,0485	0,0244

Prilikom odabira maslinovog ulja za izradu baždarnih pravaca oleokantala i oleaceina pribavljena su tri komercijalno dostupna maslinova ulja te je nakon određivanja njihovog sadržaja odabrano ono ulje s najnižim sadržajem ispitivanih sekoiridoidnih fenolnih spojeva. U maslinovom ulju *Trenton* utvrđena je najmanja količina oleokantala i oleaceina (Tablica 3) te je njihov sadržaj bio zanemariv u odnosu na sadržaj u svim ispitivanim uzorcima maslinovog ulja autohtonih hrvatskih sorti masline (rezultati u poglavlju 4.1.4.1.). Takvi rezultati bili su očekivani s obzirom na to da je maslinovo ulje *Trenton* rafinirano, za razliku od ostala dva analizirana ulja. Pored toga, u ulju *Trenton* nije bilo preklapajućih signala koji su se u nekim uljima nalazili između oleaceina i oleokantala, tj. između 9,21 i 9,23 ppm, kao što je bio slučaj kod maslinovog ulja *Zvijezda* (Slika 11). Zbog navedenih razloga, maslinovo ulje *Trenton* odabrano je za izradu baždarnih pravaca te je određivanje sadržaja odgovarajućih fenolnih spojeva u navedenom ulju ponovljeno tri puta (Tablica 4).

Tablica 4. Sadržaj oleokantala i oleaceina u fenolnom ekstraktu maslinovog ulja *Trenton*

Uzorak	P_0 oleokantal/ P_{IS}	P_0 oleacein/ P_{IS}
1	0,0485	0,0244
2	0,0432	0,0249
3	0,0682	0,0249
Srednja vrijednost	0,0533	0,0247
SD	0,0132	0,0003

4.1.3.2. Baždarni pravac za određivanje oleokantala

U svrhu izrade baždarnih pravaca pripremljeni su uzorci ulja u kojima je koncentracija oleokantala bila u rasponu od 10,0 do 350 mg/kg ulja, tako što je u maslinovo ulje odabrano za izradu baždarnih pravaca (*Trenton*) dodan određen volumen otopine standarda oleokantala, te je provedena ekstrakcija fenolnih spojeva (priprema otopina opisana je u poglavlju 3.2.1.4.). Snimljeni su ^1H NMR spektri fenolnih ekstrakata te je određen omjer površina signala oleokantala i internog standarda ($P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$). Na baždarnom pravcu prikazana je ovisnost $P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$ o koncentraciji oleokantala u uzorku maslinovog ulja, izraženoj u miligramima po kilogramu ulja ($C_{\text{oleokantal}}$). Za izradu baždarnog pravca korištene su dvije matične otopine standarda oleokantala (priprema otopina opisana je u poglavlju 3.2.1.4.1.). Koncentracija matične otopine oleokantala-1 je 0,539 mg/mL, a otopine oleokantala-2 je 0,547 mg/mL.

Otopina oleokantala-1 korištena je za pripremu niza uzoraka ulja s koncentracijom oleokantala u rasponu od 120 do 350 mg/kg, a otopina oleokantala-2 za pripremu uzoraka ulja s koncentracijom oleokantala u rasponu od 10,0 do 175 mg/kg (Tablica 5). Jednadžbe dobivenih baždarnih pravaca nalaze se u Tablici 6.

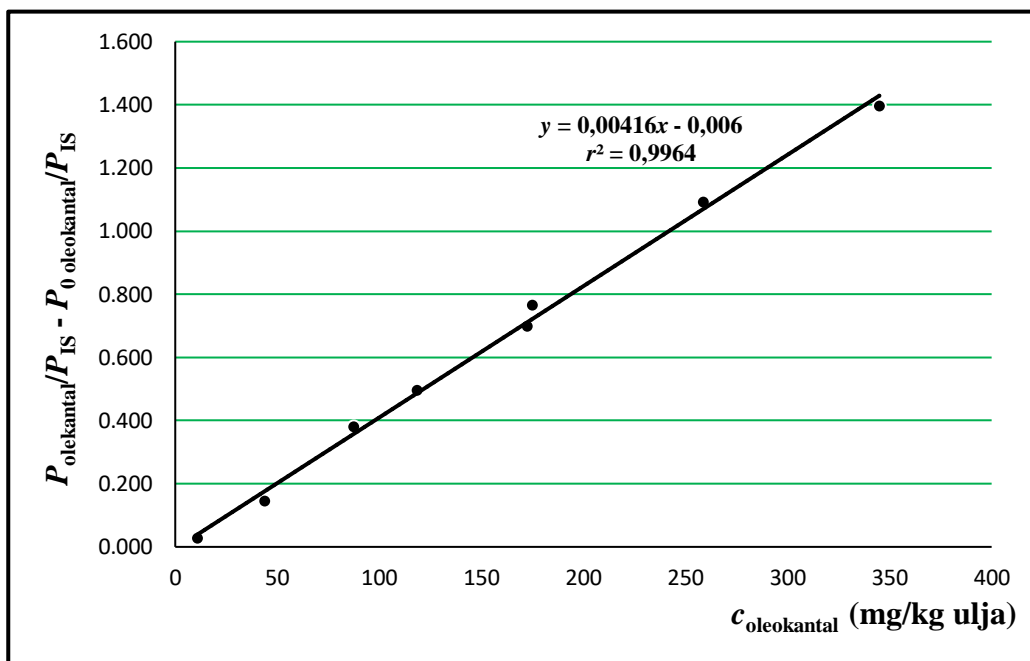
Tablica 5. Prikaz omjera površina signala oleokantala i internog standarda za niz koncentracija oleokantala u ulju

	$C_{\text{oleokantal}}$ (mg/kg ulja)	$P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$
Otopina standarda 2	10,94	0,079
	43,76	0,197
	87,52	0,434
	175,0	0,818
Otopina standarda 1	118,6	0,548
	172,5	0,751
	258,7	1,144
	345,0	1,448

Tablica 6. Baždarni pravci za određivanje sadržaja oleokantala u maslinovom ulju

Baždarni pravac	Područje linearnosti (mg/kg ulja)	Jednadžba	r^2
1	120 - 350	$y = 0,00404x + 0,069$	0,9973
2	10,0 - 175	$y = 0,00457x + 0,019$	0,9975
3	10,0 - 350	$y = 0,00416x + 0,047$	0,9964
4	10,0 - 350	$y = 0,00416x - 0,006$	0,9964

Baždarni pravci 1 i 2 dobiveni su na temelju uzoraka pripremljenih s otopinama oleokantala-1 i 2. Umjesto jedne matične otopine standarda oleokantala, korištene su dvije, iz nekoliko razloga. Zbog male mase pribavljenih standarda te njihove iznimne osjetljivosti na svjetlost i izloženost kisiku, pripravljene su matične otopine koje bi se mogle upotrijebiti u što kraćem vremenskom roku. Parametri baždarnih pravaca, dobivenih iz dvije različite matične otopine, međusobno su u skladu. U navedenim koncentracijskim područjima, oba baždarna pravca pokazuju dobru linearnu ovisnost ($r^2=0,9973$, $r^2=0,9975$). Kombinacijom baždarnih pravaca 1 i 2 dobiven je baždarni pravac 3 u koncentracijskom području oleokantala od 10,0 do 350 mg/kg maslinovog ulja, čiji odsječak na osi ordinata približno odgovara sadržaju oleokantala u maslinovom ulju *Trenton*. Krajnji baždarni pravac 4 koji se koristio za određivanje sadržaja oleokantala u maslinovim uljima, dobiven je nakon korekcije baždarnog pravca 3 s obzirom na sadržaj oleokantala u ulju *Trenton* ($P_{0 \text{ oleokantal}}/P_{IS}$) (Tablica 4). Od svakog pojedinačnog iznosa $P_{\text{olekantal}}/P_{IS}$, određenog za niz koncentracija oleokantala, oduzet je iznos $P_{0 \text{ olekantal}}/P_{IS}$ određen u *Trenton* ulju prije dodatka otopine standarda. Jednadžba baždarnog pravca 4 je $y = 0,00416 (\pm 0,00010)x - 0,006 (\pm 0,019)$, $r^2 = 0,9964$, gdje je y omjer površina signala oleokantala i internog standarda umanjena za sadržaj oleokantala prisutnog u ulju *Trenton* ($P_{\text{olekantal}}/P_{IS} - P_{0 \text{ oleokantal}}/P_{IS}$), dok je x koncentracija oleokantala u mg/kg maslinovog ulja (Slika 12).



Slika 12. Baždarni pravac 4 koji se koristi za određivanje sadržaja oleokantala u uzorcima maslinovog ulja. Na osi ordinata nalazi se omjer površina signala oleokantala i internog standarda umanjena za sadržaj oleokantala prisutnog u ulju *Trenton* ($P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}} - P_{0 \text{ oleokantal}}/P_{\text{IS}}$), a na osi apscisa koncentracija oleokantala u mg/kg.

4.1.3.3. Baždarni pravac za određivanje oleaceina

Baždarni pravac za određivanje oleaceina izrađen je pomoću uzoraka ulja u kojima je koncentracija oleaceina bila u rasponu od 10,0 do 320 mg/kg. Postupak izrade analogan je onome baždarnog pravca za određivanje oleokantala (poglavlje 4.1.3.2.). Provedeno je ^1H NMR snimanje fenolnih ekstrakata te je određen omjer površina signala oleaceina i internog standarda ($P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$). Za izradu baždarnog pravca korištene su dvije matične otopine standarda oleaceina (priprema otopina opisana je u poglavlju 3.2.1.4.1.). Koncentracija otopine oleaceina-1 je 0,418 mg/mL, a otopine oleaceina-2 je 0,512 mg/mL.

Otopina oleaceina-1 korištena je za pripremu niza uzoraka ulja s koncentracijom oleaceina u rasponu od 10,0 do 320 mg/kg, a otopina oleaceina-2 za pripremu uzoraka ulja s koncentracijom oleaceina u rasponu od 40,0 do 160 mg/kg (Tablica 7). Jednadžbe dobivenih baždarnih pravaca nalaze se u Tablici 8.

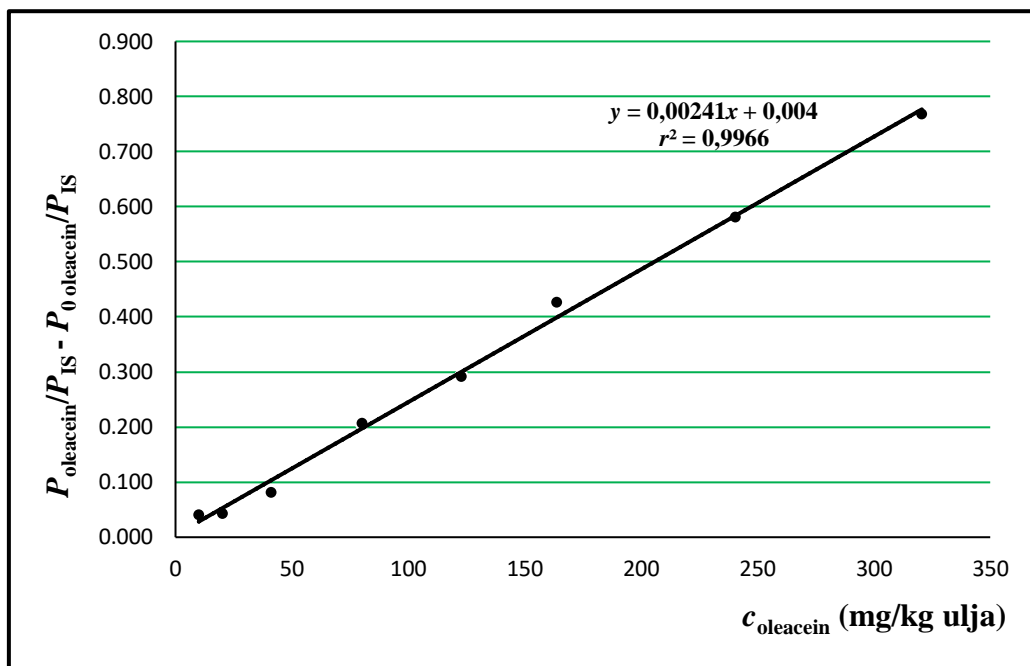
Tablica 7. Prikaz omjera površina signala oleaceina i internog standarda za niz koncentracija oleaceina u ulju

	$C_{oleacein}$ (mg/kg ulja)	$P_{oleacein}/P_{IS}$
Otopina standarda 1	10,02	0,066
	20,04	0,068
	80,16	0,232
	240,5	0,606
	320,6	0,793
Otopina standarda 2	40,96	0,107
	122,9	0,316
	163,8	0,451

Tablica 8. Baždarni pravci za određivanje sadržaja oleokantala u maslinovom ulju

Baždarni pravac	Područje linearnosti (mg/kg ulja)	jednadžba	r^2
1	10,0 - 320	$y = 0,00237x + 0,034$	0,9993
2	40,0 - 160	$y = 0,00277x - 0,011$	0,9957
3	10,0 - 320	$y = 0,00241x + 0,029$	0,9966
4	10,0 - 320	$y = 0,00241x + 0,004$	0,9966

Kombinacijom baždarnih pravaca 1 i 2, dobivenih na temelju uzoraka pripremljenih s otopinama oleaceina-1 i 2, konstruiran je baždarni pravac 3. Korekcijom baždarnog pravca 3 s obzirom na sadržaj oleaceina u maslinovom ulju *Trenton* ($P_{0\ oleacein}/P_{IS}$) (Tablica 4) dobiven je baždarni pravac 4 u koncentracijskom području oleaceina od 10,0 do 320 mg/kg maslinovog ulja. Gornja granica mjernog područja odabrana je s obzirom na dostupnu količinu otopine standarda i s obzirom na očekivane koncentracije oleaceina u maslinovom ulju, prema zasad dostupnoj literaturi (75, 76, 80, 81). Baždarni pravac 4, jednadžbe $y = 0,00241 (\pm 0,00006)x + 0,004 (\pm 0,009)$, $r^2 = 0,9966$, korišten je za određivanje sadržaja oleaceina u maslinovim uljima (Slika 13).



Slika 13. Baždarni pravac 4 koji se koristi za određivanje sadržaja oleaceina u uzorcima maslinovog ulja. Na osi ordinata nalazi se omjer površina signala oleaceina i internog standarda umanjena za sadržaj oleaceina prisutnog u ulju Trenton ($P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}} - P_{0\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$), a na osi apscisa koncentracija oleaceina u mg/kg maslinovog ulja.

4.1.4. Određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva u uzorcima maslinovog ulja autohtonih hrvatskih sorti masline

Provedena je ^1H NMR analiza sadržaja maslinovih ulja probranih autohtonih hrvatskih sorti masline kvantitativnim određivanjem sadržaja oleokantala i oleaceina te polukvantitativnim određivanjem sadržaja oleuropein i ligstrozid aglikona. Za svako ulje postupak ekstrakcije i ^1H NMR analize proveden je minimalno dva puta.

4.1.4.1. Određivanje sadržaja oleokantala i oleaceina

Određen je sadržaj oleokantala i oleaceina u sedam maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline: Bjelica (Istra), Buža (Istra), Žižolera (Istra, Oleum Maris), Žižolera (Istra, Meloto), Oblica (Ugljan), Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Snimljeni su ^1H NMR spektri fenolnih ekstrakata (u Prilogu) navedenih uzoraka maslinovih ulja te je uz primjenu izrađenih baždarnih pravaca (Slika 12 i 13) određen sadržaj spomenutih fenolnih spojeva (Tablica 9).

Tablica 9. Sadržaj oleokantala i oleaceina u uljima autohtonih hrvatskih sorti masline (u mg/kg maslinovog ulja)

Sorta	Lokalitet	$P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$	Oleokantal (mg/kg ulja)	$P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$	Oleacein (mg/kg ulja)
Bjelica	Istra	0,404	$96,7 \pm 2,9$	0,243	$80,3 \pm 25,3$
		$0,400 \pm 0,006$		$0,197 \pm 0,065$	
Buža	Istra	0,395	$47,2 \pm 1,7$	0,151	$84,0 \pm 1,1$
		$0,192 \pm 0,001$		$0,206 \pm 0,007$	
Žižolera, Oleum Maris	Istra	0,191	$66,0 \pm 2,4$	0,211	174 ± 9
		$0,271 \pm 0,004$		$0,422 \pm 0,026$	
Žižolera, Meloto	Istra	0,193	< LOQ*	0,404	< LOQ
		$0,145 \pm 0,040$		$0,047 \pm 0,011$	
Oblica	Ugljan	0,268	140 ± 10	0,039	440 ± 36
		$0,582 \pm 0,035$		$1,06 \pm 0,090$	
Oblica-slano	Ugljan	0,274	$47,9 \pm 11,0$	0,997	136 ± 7
		$0,195 \pm 0,040$		$0,331 \pm 0,022$	
Oblica	Dubrovnik	0,117	$51,9 \pm 12,9$	0,315	$55,3 \pm 0,7$
		$0,212 \pm 0,048$		$0,137 \pm 0,006$	
		0,173		0,141	

* LOQ – granica određivanja

Sadržaj oleokantala i oleaceina uvelike varira ovisno o sorti masline. Najviša koncentracija oleokantala prisutna je u sorti Oblica (Ugljan) (140 ± 10 mg/kg), dok su nešto niže koncentracije zabilježene u sortama Bjelica (Istra) i Žizolera, Oleum Maris (Istra). Približno isti sadržaj oleokantala prisutan je u sortama Buža (Istra), Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Značajno niža koncentracija oleokantala zabilježena je kod sorte Oblica-slano (Ugljan) ($47,9 \pm 11,0$) u usporedbi s uljem dobivenim od ploda iste sorte koji prije procesa prerade nije čuvan u moru. Uslijed skladištenja ploda masline u morskoj vodi, došlo je do smanjenja sadržaja navedenih fenolnih spojeva. Daleko najviša koncentracija oleaceina zabilježena je u sorti Oblica (Ugljan) (440 ± 36 mg/kg), analogno sadržaju oleokantala. Navedena koncentracija oleaceina izvan je mjernog područja baždarnog pravca (320 mg/kg), ali ne značajno, te se može očekivati kako i kod tih vrijednosti vrijedi linearan odnos, stoga je navedena koncentracija oleaceina ekstrapolirana. Nešto niže koncentracije oleaceina prisutne su u sortama Žizolera, Oleum Maris (Istra) i Oblica-slano (Ugljan). Približno isti sadržaj oleaceina zabilježen je u sortama Bjelica (Istra) i Buža (Istra). U nekim uzorcima, kao što je slučaj za oleacein kod sorte Bjelica (Istra), integracija signala bila je otežana zbog djelomičnog preklapanja sa signalima drugih aldehidnih protona nepoznatih spojeva, koje se nije moglo otkloniti snimanjem uzoraka na 600 MHz NMR instrumentu. Slično opažanje zabilježeno je u literaturi (75) te se njime može objasniti veća pogreška kod određivanja analiziranih spojeva u određenim uzorcima. Bez obzira na slabije razdvajanje signala koje je odraz jedinstvenog fenolnog profila svake pojedine sorte, sadržaj navedenih spojeva u takvim uzorcima mogao se dobro procijeniti. Očekivane razine oleokantala i oleaceina, utvrđene analizom preko 170 različitih uzoraka ulja s područja Grčke i Kalifornije, u rasponu su od nedetektibilnih razina sve do 350 i 300 mg/kg, redom (75), dok su u nekim sortama zabilježene koncentracije i do 711 i 588 mg/kg ulja, redom (76). Sadržaj sekoiridoidnih fenolnih spojeva maslinovih ulja s područja Tunisa analiziranih istom analitičkom metodom bio je u rasponu od 162 do 529 mg/kg za oleokantal te od 118 do 246 mg/kg za oleacein (77). Bilušić et al. analizirali su fenolni sadržaj nekoliko hrvatskih sorti masline: Drobница, Krvavica, Lastovka, Buhavica i Oblica. Utvrđene razine oleokantala bile su u rasponu od 26 do 274 mg/kg, a razine oleaceina od 20 do 697 mg/kg (80, 81). Fenolni sastav sorti Bjelica, Buža i Žizolera analiziran kvantitativnom ^1H NMR spektroskopijom dosad nije zabilježen u literaturi. Prema našim saznanjima, ovo su prvi podaci o sekoiridoidnom fenolnom sadržaju navedenih hrvatskih sorti. Utvrđeni sadržaj oleokantala unutar je ranije navedenih očekivanih granica, dok bi se sadržaj oleaceina mogao smatrati jako visokim, posebno u slučaju sorte Oblica (Ugljan) (440 ± 36 mg/kg). Zanimljivo je napomenuti kako Karkoula et al. (2014) ističu da je u većini analiziranih maslinovih ulja koncentracija

oleokantala bila veća nego koncentracija oleaceina (76), dok se u ovoj analizi pokazalo kako je u ispitanim sortama sadržaj oleaceina bio veći nego sadržaj oleokantala. Iznimka je maslinovo ulje sorte Bjelica (Istra), dok se kod sorte Žižolera, Meloto (Istra) sadržaj nije mogao pouzdano odrediti jer je bio manji od limita određivanja metode. Sličan odnos tih dvaju sekoiridoida zamijećen je i u drugim hrvatskim sortama masline (80). Usporedbom sadržaja dvaju maslinovih ulja sorte Žižolera s područja Istre te maslinovih ulja sorte Oblice s otoka Ugljana i iz Dubrovnika, vidljivo je kako osim sorte na fenolni sadržaj uvelike utječu i ostali čimbenici, kao što su vrijeme berbe, geografsko porijeklo i drugi agroklimatski faktori. Analizom sadržaja maslinovih ulja s područja Španjolske pokazano je kako je izmjereni sadržaj oleokantala bio vidljivo veći u ulju dobivenom od organski uzgojenih maslina (169 mg/kg) u usporedbi s uljem dobivenim konvencionalnim uzgojem (118 mg/kg) (78). Pored toga, Diamantakos et al. (2020) ističu i mogući utjecaj različitih proizvodnih postupaka maslinovog ulja na sadržaj sekoiridoidnih fenolnih spojeva poput oleokantala i oleaceina (79).

4.1.4.2. Polu-kvantitativno određivanje sadržaja oleuropein i ligstrozid aglikona

Sadržaj oleuropein i ligstrozid aglikona određen je polu-kvantitativno u sedam maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline: Bjelica (Istra), Buža (Istra), Žižolera (Istra, Oleum Maris), Žižolera (Istra, Meloto), Oblica (Ugljan), Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Sadržaj je izražen kao omjer površina odgovarajućih signala i internog standarda ($P_{oleuropein\ aglikon}/P_{IS}$, $P_{ligstrozid\ aglikon}/P_{IS}$) (Tablica 10).

Tablica 10. Sadržaj oleuropein i ligstrozid aglikona u uljima autohtonih hrvatskih sorti masline, izražen kao omjer površina odgovarajućih signala i internog standarda

Sorta	Lokalitet	$P_{oleuropein\ aglikon}/P_{IS}$		$P_{ligstrozid\ aglikon}/P_{IS}$	
Bjelica	Istra	0,283	$0,289 \pm 0,008$	0,182	$0,196 \pm 0,019$
		0,294		0,209	
Buža	Istra	0,040	$0,038 \pm 0,003$	0,009	$0,009 \pm 0,001$
		0,036		0,008	
Žižolera, Oleum Maris	Istra	0,869	$0,866 \pm 0,005$	0,107	$0,111 \pm 0,005$
		0,862		0,114	
Žižolera, Meloto	Istra	0,075	$0,077 \pm 0,002$	0,028	$0,028 \pm 0,000$
		0,078		0,028	
Oblica	Ugljan	0,184	$0,191 \pm 0,009$	0,037	$0,040 \pm 0,004$
		0,197		0,043	
Oblica-slano	Ugljan	0,100	$0,102 \pm 0,002$	0,020	$0,027 \pm 0,009$
		0,103		0,033	
Oblica	Dubrovnik	0,110	$0,109 \pm 0,002$	0,022	$0,026 \pm 0,006$
		0,107		0,030	

Usporedbom dobivenih rezultata, vidljivo je kako sadržaj oleuropein i ligstrozid aglikona uvelike ovisi o pojedinoj sorti masline. Najveća količina oleuropein aglikona zabilježena je u sortama Žižolera, Oleum Maris i Bjelica, s područja Istre. Navedeni sadržaj oleuropein aglikona sorte Žižolera, Oleum Maris značajno odstupa od sadržaja ostalih sorti. Nešto niži sadržaj navedenog aglikona prisutan je u sorti Oblica (Ugljan), dok su gotovo podjednake razine zabilježene u sortama Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Slično kao i kod oleokantala i oleaceina, zamijećeno je smanjenje sadržaja oleuropein i ligstrozid aglikona kod sorte Oblica-slano (Ugljan) u usporedbi s maslinovim uljem dobivenim bez

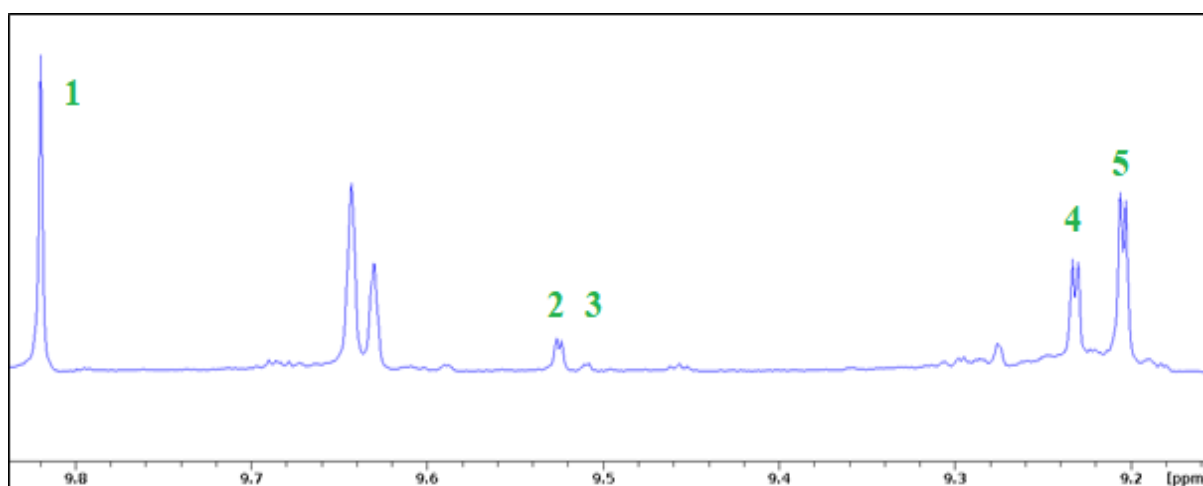
prethodnog skladištenja plodova u morskoj vodi (Oblica, Ugljan). Ligstrozid aglikon u najvećoj mjeri zastupljen je u sortama Bjelica (Istra) i Žižolera, Oleum Maris (Istra), analogno sadržaju oleuropein aglikona, s time da je u ovom slučaju sadržaj navedenog fenola dvostruko veći u sorti Bjelica. Niža količina ligstrozid aglikona prisutna je u maslinovom ulju sorte Oblica (Ugljan), dok su vrlo slične razine utvrđene u sortama Žižolera, Meloto (Istra), Oblica-slano (Ugljan) te Oblica (Dubrovnik). U svim analiziranim sortama maslinovog ulja, oleuropein aglikon bio je zastupljen u većoj mjeri nego ligstrozid aglikon.

4.1.5. Validacija metode

Nakon utvrđivanja optimalnih postavki snimanja i obrade ^1H NMR spektara, provedena je validacija metode ispitivanjem selektivnosti, preciznosti, linearnosti, granice dokazivanja i granice određivanja (88).

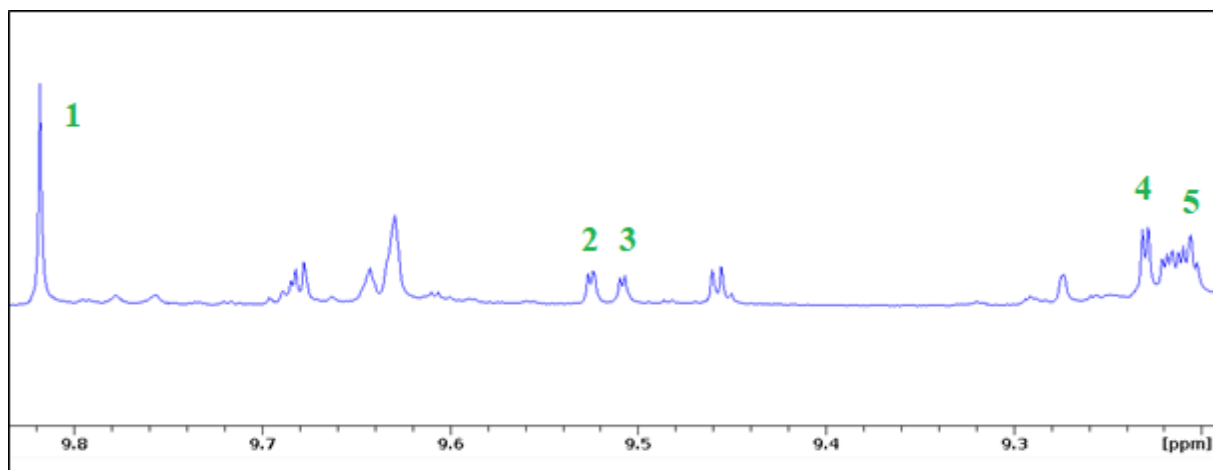
4.1.5.1. Selektivnost

Selektivnost, tj. mogućnost analitičke metode da razlikuje analiziranu komponentu u prisustvu drugih spojeva prisutnih u matriksu uzorka ispitana je za oleacein (9,21 ppm), oleokantal (9,23 ppm), ligstrozid aglikon (9,51 ppm), oleuropein aglikon (9,53 ppm) te za interni standard siringaldehid (9,82 ppm). Analizirani su spektri ekstrakata maslinovih ulja različitih sorti masline te je u većini utvrđeno dobro razdvajanje dubleta oleokantala i oleaceina, ligstrozid i oleuropein aglikona te singleta siringaldehida od ostalih komponenti ekstrakta (Slika 14).



Slika 14. ^1H NMR spektar maslinovog ulje sorte Oblica (Ugljan). 1 – interni standard, 2 – oleuropein aglikon, 3 – ligstrozid aglikon, 4 – oleokantal, 5 – oleacein.

Kod ekstrakta sorte Bjelica (Istra) (Slika 15), Žižolera, Oleum Maris (Istra) i Žižolera, Meloto (Istra) zabilježeno je nešto lošije razdvajanje dubleta oleaceina. Poteškoće prilikom integracije određenih signala u pojedinim sortama masline već su ranije opisane u literaturi (75) te se njima mogu objasniti veće relativne pogreške kod određivanja spomenutih spojeva.



Slika 15. ^1H NMR spektar maslinovog ulje sorte Bjelica (Istra). 1 – interni standard, 2 – oleuropein aglikon, 3 – ligstrozid aglikon, 4 – oleokantal, 5 – oleacein.

4.1.5.2. Preciznost

Preciznost analitičke metode, tj. stupanj slaganja niza dobivenih rezultata mjerenja istog uzorka, pri istim propisanim uvjetima, utvrđen je usporedbom ponovljenih mjerenja sadržaja oleokantala i oleaceina (Tablica 11) te oleuropein i ligstrozid aglikona (Tablica 12). Mjerenja su provedena u istom danu (ponovljivost) te tijekom duljeg vremenskog razdoblja (srednja preciznost) na uzorcima u kojima je utvrđeno dobro razdvajanje analiziranih signala.

Tablica 11. Izmjereni sadržaj oleokantala i oleaceina korišten za određivanje ponovljivosti i srednje preciznosti

Ponovljivost - Oleokantal		
Uzorak*	$P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$	$C_{\text{oleokantal}}$ (mg/kg)
1	0,191	46,9
2	0,193	47,4

Srednja preciznost - Oleokantal		
Uzorak**	$P_{\text{oleokantal}}/P_{\text{IS}}$	$C_{\text{oleokantal}}$ (mg/kg)
1	0,557	134
2	0,606	146

Ponovljivost - Oleacein		
Uzorak*	$P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$	C_{oleacein} (mg/kg)
1	0,211	86,1
2	0,201	82,0

Srednja preciznost - Oleacein		
Uzorak**	$P_{\text{oleacein}}/P_{\text{IS}}$	C_{oleacein} (mg/kg)
1	0,997	414
2	1,12	467

* Buža (Istra)

** Oblica (Ugljan)

Tablica 12. Izmjereni sadržaj oleuropein i ligstrozid aglikona korišten za određivanje ponovljivosti i srednje preciznosti

Ponovljivost – oleuropein aglikon		Srednja preciznost – oleuropein aglikon	
Uzorak*	$P_{\text{oleuropein aglikon}}/P_{\text{IS}}$	Uzorak**	$P_{\text{oleuropein aglikon}}/P_{\text{IS}}$
1	0,869	1	0,075
2	0,862	2	0,078

Ponovljivost – ligstrozid aglikon		Srednja preciznost – ligstrozid aglikon	
Uzorak*	$P_{\text{ligstrozid aglikon}}/P_{\text{IS}}$	Uzorak**	$P_{\text{ligstrozid aglikon}}/P_{\text{IS}}$
1	0,107	1	0,028
2	0,114	2	0,028

* Žizolera (Oleum Maris) ** Žizolera (Meloto)

Tablica 13. Parametri preciznosti

Analit	Preciznost	
	relativna standardna devijacija (RSD) (%)	
	Ponovljivost	Srednja preciznost
Oleokantal	0,70	5,97
Oleacein	3,67	8,50
Oleuropein aglikon	0,60	2,86
Ligstrozid aglikon	4,30	1,52

RSD u svim slučajevima je manja od 6 %, uz iznimku srednje preciznosti određene za oleacein gdje iznosi 8,50 % (Tablica 13). Ta vrijednost može se objasniti time što su u uzorku sorte Oblica (Ugljan) utvrđene koncentracije oleaceina bile iznimno visoke (414, 467 mg/kg) te su se nalazile izvan mjernog područja baždarnog pravca (350 mg/kg), ali ne u velikoj mjeri, stoga se moglo pretpostaviti kako i kod tih vrijednosti vrijedi linearan odnos i kvantitativnost ekstrakcije fenolnih spojeva. Utvrđena preciznost odnosi se na pogrešku prilikom ekstrakcije fenolnih spojeva, uz sve mjere koje su provedene kako bi se izbjegla degradacija fenolnih

spojeva, te na pogrešku analize NMR spektara, tj. njihovog integriranja. Navedene mjere sastojale su se od čuvanja maslinovog ulja na niskoj temperaturi (4 °C), minimaliziranja njegovog izlaganja svjetlosti i kisiku, niske temperature isparavanja otapala (33 °C) te čuvanja suhih ekstrakata do NMR analize na niskoj temperaturi (-8 °C). Dodatno je utvrđena preciznost samog integriranja, koja je provedena snimanjem većeg broja spektara istog uzorka, a zatim su integrirani signali fenolnih spojeva od interesa. Dobiveni rezultati su uspoređeni te je izračunana njihova relativna standardna devijacija (Tablica 14).

Tablica 14. Preciznost integriranja

Uzorak Bjelica	$P_{oleokantal}/P_{IS}$	$P_{oleacein}/P_{IS}$	$P_{oleuropein}$ aglikon/ P_{IS}	$P_{ligstrozid}$ aglikon/ P_{IS}
Mjerenje 1	0,4500	0,2754	0,2957	0,1996
Mjerenje 2	0,4419	0,2580	0,2926	0,1977
Mjerenje 3	0,4561	0,2772	0,3227	0,1908
Srednja vrijednost	0,4493	0,2702	0,3037	0,1960
SD	0,0071	0,0106	0,0166	0,0046
RSD	1,59 %	3,92 %	5,45 %	2,36 %

Na temelju dobivenih vrijednosti ponovljivosti i srednje preciznosti, može se zaključiti kako je navedena metoda precizna te da ju se može koristiti za određivanje sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva maslinovog ulja, unutar prihvatljivih granica.

4.1.5.3. Linearnost

Linearnost analitičke metode, tj. njena sposobnost da unutar određenih granica daje rezultate linearno proporcionalne koncentraciji analiziranog spoja, ispitana je na osam koncentracijskih razina standarada oleokantala i oleaceina u uzorcima maslinovog ulja (priprema uzoraka opisana u poglavlju 3.2.1.4.). Konstruirani su linearni regresijski pravci (Slika 12 i 13), a dobiveni parametri linearnosti nalaze se u Tablici 15. U jednadžbama pravca, y predstavlja $P_{fenolni\ spoj}/P_{IS} - P_{0\ fenolni\ spoj}/P_{IS}$, tj. omjer površine signala fenolnog spoja i internog standarda u uzorku maslinovog ulja umanjen za omjer površine fenolnog spoja i internog standarda određenog u ulju *Trenton*, dok x predstavlja koncentraciju fenolnog spoja u miligramima po kilogramu maslinovog ulja.

Tablica 15. Parametri linearnosti

Analit	Linearnost				
	područje linearnosti (mg/kg)	jednadžba	r^2 *	s_a **	s_b ***
Oleokantal	10,0 - 350,0	$y = 0,00416x - 0,006$	0,9964	0,00010	0,019
Oleacein	10,0 - 320,0	$y = 0,00241x + 0,004$	0,9966	0,00006	0,009

* koeficijent korelacije, ** standardno odstupanje nagiba pravca, *** standardno odstupanje odsječka pravca

Koeficijenti korelacije ($r^2 = 0,9964$, $r^2 = 0,9966$) ukazuju na to kako je postignuta vrlo dobra linearnost analitičke metode u širokom koncentracijskom području što je dodatno potvrđeno iznimno niskom relativnom pogreškom nagiba i odsječka pravca. Relativna pogreška nagiba baždarnog pravca za određivanje oleokantala iznosi 2,38 %, dok za baždarni pravac oleaceina iznosi 4,17 %. Linearnost pravaca odraz je validnosti cjelokupnog postupka, od ekstrakcije fenolnih spojeva iz maslinovog ulja, do kvantitativne NMR spektroskopske analize, tj. valjane interpretacije i dosljedne integracije željenih signala. Dobivena linearnost potvrđuje kako je opisanim postupkom ekstrakcije moguće kvantitativno ekstrahirati fenolne spojeve iz ulja. Utvrđena odstupanja u skladu su s očekivanjima, a dobiveni koeficijenti korelacije usporedivi s onima dostupnima u literaturi (75).

4.1.5.4. Osjetljivost

Granica dokazivanja (LOD) predstavlja najnižu količinu analita koja se može detektirati, ali ne i odrediti, dok se granica određivanja analitičke metode (LOQ) smatra najnižom količinom analita koju je moguće utvrditi s prihvatljivom točnošću i preciznošću. Granice dokazivanja i određivanja oleokantala i oleaceina (Tablica 16) izračunane su na temelju standardnog odstupanja odsječka pravca i nagiba pravca (postupak opisan u poglavlju 3.2.1.5.).

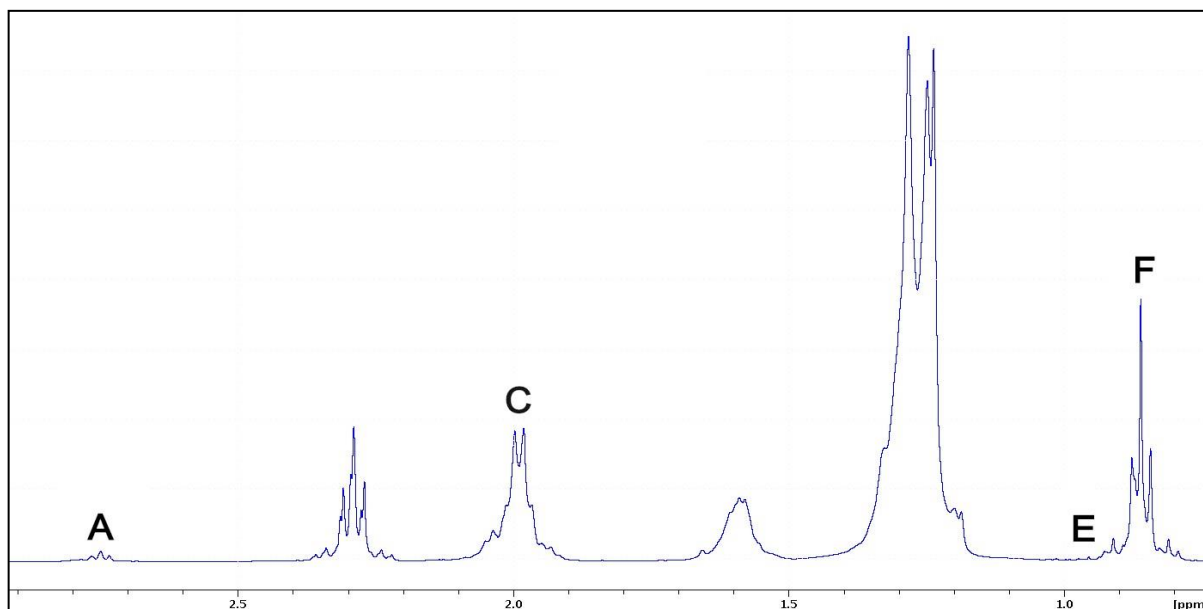
Tablica 16. Granice dokazivanja i određivanja

Analit	Osjetljivost	
	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Oleokantal	14,78	44,79
Oleacein	12,70	38,47

Osjetljivost NMR analitičke metode za određivanje oleokantala i oleaceina u dostupnim radovima utvrđena je određivanjem granice dokazivanja i određivanja preko omjera signala i šuma (3:1, 10:1). Dobivene vrijednosti za oleokantal i oleacein iznosile su 1 i 10 mg/kg, redom, za oba spoja (75). Ako se usporede granice dokazivanja i određivanja oleokantala i oleaceina izračunane preko standardnog odstupanja odsječka pravca i nagiba pravca vidljivo je kako su nešto više nego one navedene u literaturi. Bez obzira na to, u analiziranim maslinovim uljima bilo je moguće kvantificirati navedene fenolne spojeve, uz iznimku jednog uzorka maslinovog ulja sorte Žižolera, Meloto (Istra) u kojem je koncentracija oleokantala i oleaceina bila iznad granice dokazivanja, ali ispod granice određivanja.

4.2. Određivanje udjela masnih kiselina u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline

Provedena je polu-kvantitativna ^1H NMR analiza zastupljenosti pojedinih masnih kiselina u maslinovim uljima, tj. određen je njihov udio u odnosu na ukupan sadržaj masnih kiselina.



Slika 16. ^1H NMR spektar maslinovog ulja sorte Buža. Udio masnih kiselina određen je integracijom označenih signala.

Snimljen je ^1H NMR spektar maslinovog ulja te su ručno integrirani signali na 0,88 ppm (*F*), 0,98 ppm (*E*), 2,02 ppm (*C*) i 2,78 ppm (*A*) (Slika 16). Prema ranije utvrđenom postupku (74) izračunana je zastupljenost α -linolenske (*Ln*), linolne (*L*), oleinske (*O*) i palmitinske (*P*) kiseline u pojedinom uzorku maslinovog ulja.

$$Ln = \frac{E}{3}$$

$$L = \frac{A - 4Ln}{2}$$

$$O = \frac{C - 4L - 4Ln}{4}$$

$$P = \frac{F - 3L - 3O}{3}$$

Oznake *E*, *F*, *C* i *A* iz navedenih jednadžbi označavaju površine pripadajućih signala (Slika 16, Tablica 17). Kako bi se izračunali udjeli pojedine masne kiseline, potrebno je podijeliti vrijednost masne kiseline dobivene iz gornjih jednadžbi sa zbrojem svih dobivenih vrijednosti masnih kiselina te pomnožiti sa 100.

$$L_n (\%) = \frac{L_n}{L_n + L + O + S} \cdot 100$$

$$L (\%) = \frac{L}{L_n + L + O + S} \cdot 100$$

$$O (\%) = \frac{O}{L_n + L + O + S} \cdot 100$$

$$P (\%) = \frac{P}{L_n + L + O + S} \cdot 100$$

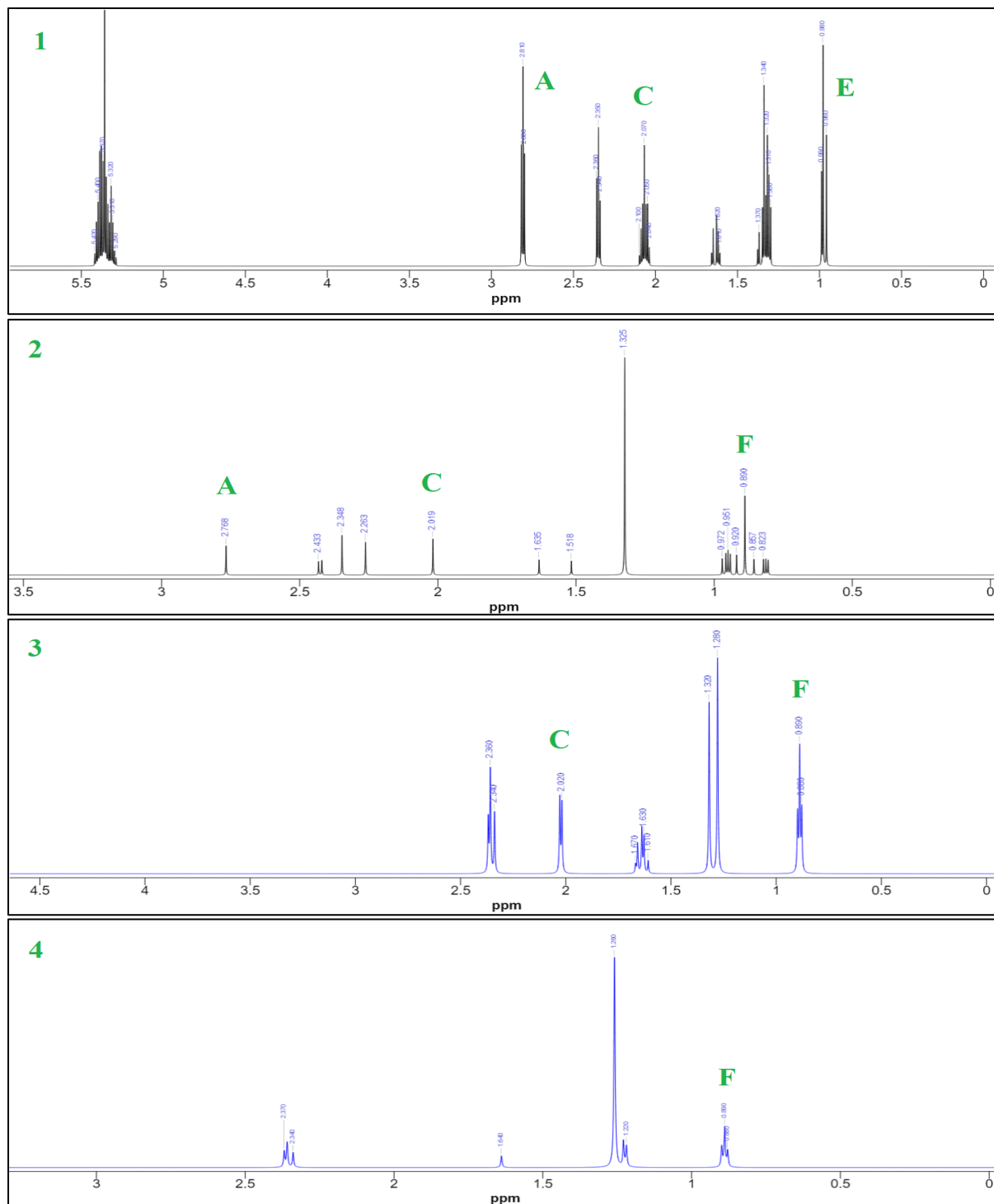
Tablica 17. Prikaz pojedinih protona masnih kiselina (MK) koji doprinose određenim signalima i njihovi kemijski pomaci u ^1H NMR spektru maslinovog ulja (Slika 16).

Prilagođeno iz (70)

Pik	δ (ppm)	Proton	Masne kiseline
<i>A</i>	2,78	$\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$	Linolna i α -linolenska MK
<i>C</i>	2,02	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$	Nezasićene MK
<i>E</i>	0,98	$\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$	α -linolenska MK
<i>F</i>	0,88	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Sve MK osim α -linolenske

Dobiveni spektri maslinovih ulja analizirani su polazeći od spektara standarada masnih kiselina (Slika 17). Pik *F* predstavlja triplet smješten na 0,88 ppm koji potječe od protona terminalne metilne skupine analiziranih masnih kiselina, izuzev α -linolenske kiseline. Pik *E* smješten na 0,98 ppm potječe od protona terminalne metilne skupine α -linolenske kiseline. Protoni metilne skupine α -linolenske kiseline u nižem su polju, tj. njihov kemijski pomak veći je za $\sim 0,10$ ppm u usporedbi s kemijskim pomakom protona metilnih skupina ostalih masnih kiselina. Do takve pojave dolazi zbog različitih kemijskih okolina njihovih vodikovih atoma.

Zbog prisustva elektron-odvlačeće skupine, tj. utjecaja dvostruke veze smještene u blizini terminalne metilne skupine α -linolenske kiseline, protoni metilne skupine manje su zasjenjeni. Tzv. *de-shielding* efekt također objašnjava $\sim 0,76$ ppm razliku u kemijskom pomaku CH_2 skupine nezasićenih masnih kiselina (pik C) i CH_2 skupine linolne i α -linolenske kiseline (pik A) (74).



Slika 17. ^1H NMR spektri masnih kiselina. 1 - α -linolenska, 2 – linolna, 3 – oleinska, 4 – palmitinska masna kiselina. Prilagođeno iz (97).

4.2.1. Udio masnih kiselina u maslinovom ulju

Određen je udio pojedinih masnih kiselina (Tablica 18) u sedam maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline: Bjelica (Istra), Buža (Istra), Žizolera (Istra, Oleum Maris), Žizolera (Istra, Meloto), Oblica (Ugljan), Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). Mjerenje sadržaja masnih kiselina izvedeno je u duplikatu. Snimljeni su ¹H NMR spektri navedenih maslinovih ulja (u Prilogu) i interpretirani na način opisan u poglavlju 4.2..

18. Udio oleinske, linolne, α -linolenske i palmitinske masne kiseline u uljima autohtonih hrvatskih sorti masline

Sorta	Lokalitet	Oleinska kiselina (%)		Linolna kiselina (%)		α -Linolenska kiselina (%)		Palmitinska kiselina (%)	
Bjelica	Istra	82,2	82,1 \pm 0,1	3,1	3,9 \pm 1,1	0,3	0,4 \pm 0,1	14,4	13,8 \pm 0,9
		82,0		4,6		0,4		13,1	
Buža	Istra	83,8	87,2 \pm 4,8	3,7	4,0 \pm 0,4	0,3	0,4 \pm 0,1	12,2	8,6 \pm 5,2
		90,5		4,2		0,4		4,9	
Žizolera, Oleum Maris	Istra	71,6	69,8 \pm 2,6	6,8	5,4 \pm 2,1	0,4	0,4 \pm 0,0	21,3	24,6 \pm 4,7
		67,9		3,9		0,4		27,9	
Žizolera, Meloto	Istra	88,9	88,5 \pm 0,6	2,0	2,3 \pm 0,4	0,2	0,2 \pm 0,0	8,9	9,1 \pm 0,3
		88,0		2,5		0,2		9,3	
Oblica	Ugljan	81,0	80,3 \pm 1,0	5,9	6,0 \pm 0,1	0,4	0,4 \pm 0,0	12,7	13,4 \pm 0,9
		79,6		6,1		0,4		14,0	
Oblica-slano	Ugljan	78,5	78,3 \pm 0,3	5,9	6,0 \pm 0,1	0,5	0,5 \pm 0,0	15,2	15,3 \pm 0,1
		78,1		6,1		0,5		15,4	
Oblica	Dubrovnik	72,5	73,3 \pm 1,1	11,2	11,2 \pm 0,0	0,3	0,4 \pm 0,1	16,0	15,2 \pm 1,1
		74,0		11,2		0,4		14,4	

Udio ispitanih masnih kiselina razlikuje se u maslinovim uljima različitih sorti masline. Oleinska kiselina u najvećoj mjeri zastupljena je u sortama Žizolera, Meloto (Istra) (88,5 \pm 0,6 %) i Buža (Istra) (87,2 \pm 4,8 %). Približno isti udio oleinske kiseline prisutan je u sortama Bjelica (Istra), Oblica (Ugljan) i Oblica-slano (Ugljan). Najviši udio linolne kiseline zabilježen je u maslinovom ulju sorte Oblica (Dubrovnik) (11,2 \pm 0,0 %) te nešto niži udio u sorti Oblica (Ugljan) te Oblica-slano (Ugljan). Među ispitanim uljima, sorta Oblica-slano (Ugljan) ističe se po visokom sadržaju α -linolenske kiseline (0,5 \pm 0,0 %), dok je podjednak udio zabilježen u sortama Bjelica (Istra), Žizolera, Oleum Maris (Istra), Oblica (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik).

Palmitinska kiselina u najvećoj mjeri zastupljena je u sorti Žižolera, Oleum Maris (Istra) ($24,6 \pm 4,7$ %) te u sortama Oblica-slano (Ugljan) i Oblica (Dubrovnik). U uljima Oblica (Ugljan) i Oblica-slano (Ugljan) zabilježene su vrlo slične vrijednosti ispitanih masnih kiselina, stoga se može zaključiti kako postupak skladištenja ploda masline u morskoj vodi ne utječe na sastav masnih kiselina. Istim postupkom analiziran je udio masnih kiselina maslinovih ulja s područja Turske. Utvrđeni udio oleinske kiseline bio je u rasponu od 38,6 do 79,4 %, udio linolne kiseline od 3,4 do 31,9 %, α -linolenske kiseline od 1,3 do 3,0 % te palmitinske kiseline od 14,2 do 26,5 % (74). U dosad analiziranim maslinovim uljima hrvatskih sorti masline, udio oleinske, linolne, α -linolenske i palmitinske kiseline bio je 62,5 – 75,0 %, 6,6 – 13,3 %, 0,6 – 0,9 % i 11,4 – 19,2 %, redom (80, 81). Ispitani sadržaj masnih kiselina u skladu je s dostupnom literaturom. Udio oleinske kiseline u svih 7 sorti mogao bi se smatrati jako visokim, pogotovo u slučaju sorti Žižolera, Meloto i Buža, s područja Istre.

5. ZAKLJUČCI

¹H NMR spektroskopija brza je, jednostavna i pouzdana metoda analize sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva i masnih kiselina u složenim smjesama poput maslinovog ulja.

Sadržaj oleokantala i oleaceina te oleuropein i ligstrozid aglikona maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti Buža, Bjelica i Žižolera po prvi puta je analiziran ¹H NMR spektroskopijom.

Sva ispitana maslinova ulja imaju značajan sadržaj oleokantala i oleaceina u usporedbi s podacima iz literature.

Sadržaj sekoiridoidnih fenolnih spojeva i masnih kiselina znatno varira u maslinovim uljima različitih sorti masline te ovisi o geografskom porijeklu.

Najviša koncentracija oleokantala utvrđena je u sorti Oblica (Ugljan) (140 ± 10 mg/kg), dok su nešto niže koncentracije zabilježene u sortama Bjelica (Istra) ($96,7 \pm 2,9$ mg/kg) i Žižolera, Oleum Maris (Istra) ($66,0 \pm 2,4$ mg/kg).

Iznimno visoka koncentracija oleaceina u usporedbi s podacima u literaturi zabilježena je u sorti Oblica (Ugljan) (440 ± 36 mg/kg), a nešto niži sadržaj utvrđen je u sortama Žižolera, Oleum Maris (Istra) (174 ± 9 mg/kg) i Oblica-slano (Ugljan) (136 ± 7 mg/kg).

U maslinovom ulju sorte Žižolera, Meloto (Istra) zabilježen je najniži sadržaj oleokantala i oleaceina.

Maslinova ulja sorti Žižolera, Meloto (Istra) i Buža (Istra) ističu se po visokom udjelu oleinske kiseline: 88,5 % i 87,2 %, redom. Najviši udio linolne kiseline zabilježen je u maslinovom ulju sorte Oblica (Dubrovnik) ($11,2 \pm 0,0$ %), dok se po visokom sadržaju palmitinske kiseline ističe sorta Žižolera, Oleum Maris (Istra) ($24,6 \pm 4,7$ %).

Maslinovo ulje dobiveno od ploda masline koji je čuvan u moru prije procesa prerade u ulje ima znatno niži sadržaj sekoiridoidnih fenolnih spojeva.

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.

U svim analiziranim maslinovim uljima oleuropein aglikon zastupljen je u većoj mjeri nego ligstrozid aglikon.

Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se prepoznali uvjeti u kojima se dobiva ulje koje ima najveći sadržaj navedenih spojeva.

Dobiveni rezultati pridonijet će prepoznavanju maslinovih ulja koja su posebno bogata sekoiridoidnim fenolnim spojevima te će se dobiti uvid o potencijalu hrvatskih maslinovih ulja kao vrijednom izvoru ovih biološki aktivnih spojeva, koja bi mogla poslužiti u razvoju novih farmaceutskih proizvoda.

U sklopu daljnjeg istraživanja planira se ispitati biološka aktivnost fenolnih ekstrakata maslinovih ulja te povezanost utvrđene aktivnosti sa sadržajem sekoiridoidnih fenolnih spojeva.

6. ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Cvijeti Jakobišić Brala na pruženoj prilici, neizmjernom strpljenju, konstantnoj podršci i stručnom vodstvu prilikom izrade i pisanja ovog rada. Hvala Vam na jednom predivnom i jedinstvenom iskustvu te na motivaciji za daljnji rad u znanosti.

Iskreno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić, članovima Zavoda za fizikalnu kemiju te Zavoda za farmaceutsku kemiju i prof. dr. sc. Đaniju Benčiću na svojoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Posebna zahvala mojoj obitelji, sestri Almi i svim prijateljima na beskrajnoj potpori i strpljenju.

7. POPIS LITERATURE

1. Leri M, Scuto M, Ontario ML, Calabrese V, Calabrese EJ, Bucciantini M, et al. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 21 (2020) 1250.
2. Fernández del Río L, Gutiérrez-Casado E, Varela-López A, Villalba JM. Olive Oil and the Hallmarks of Aging. *Molecules* 21 (2016) 163.
3. Serino A, Salazar G. Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease. *Nutrients* 11 (2019) 53.
4. Serreli G, Deiana M. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Modulation of Cellular Pathways Related to Oxidant Species and Inflammation in Aging. *Cells* 9 (2020) 478.
5. Buckland G, Gonzalez CA. The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *Br J Nutr* 113 (2015) 94–101.
6. Nikou T, Liaki V, Stathopoulos P, Sklirou AD, Tsakiri EN, Jakschitz T, et al. Comparison survey of EVOO polyphenols and exploration of healthy aging-promoting properties of oleocanthal and oleacein. *Food Chem Toxicol.* 125 (2019) 403–412.
7. *World Health Organization* - <https://www.who.int/ageing/healthy-ageing/en/> ; pristupljeno 10.6.2020.
8. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 61 (1995) 1402S-1406S.
9. *World health organization* - <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> ; pristupljeno 9. ožujka 2020.
10. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med.* 378 (2018) e34(1)-e34(14).
11. Grosso G, Marventano S, Yang J, Micek A, Pajak A, Scalfi L, et al. A comprehensive meta-analysis on evidence of Mediterranean diet and cardiovascular disease: Are individual components equal? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57 (2017) 3218–3232.
12. Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol Ser A-Biol Sci Med Sci.* 73 (2018) 318–326.

13. Medina-Remon A, Casas R, Tresserra-Rimbau A, Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Fito M, et al. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br J Clin Pharmacol.* 83 (2017) 114–128.
14. Gao X, Chen H, Fung TT, Logroscino G, Schwarzschild MA, Hu FB, Ascherio A. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am J Clin Nutr.* 86 (2007) 1486-1494.
15. Anastasiou CA, Yannakoulia M, Kosmidis MH, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Sakka P, et al. Mediterranean diet and cognitive health: Initial results from the Hellenic Longitudinal Investigation of Ageing and Diet. *PLoS One* 12 (2017) e0182048.
16. Hardman RJ, Kennedy G, Macpherson H, Scholey AB, Pipingas A. Adherence to a Mediterranean-Style Diet and effects on Cognition in Adults: A Qualitative evaluation and Systematic Review of Longitudinal and Prospective Trials. *Front Nutr.* 3 (2016) 22.
17. Salas-Salvado J, Guasch-Ferre M, Lee C-H, Estruch R, Clish CB, Ros E. Protective Effects of the Mediterranean Diet on Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. *J Nutr.* 146 (2016) 920S-927S.
18. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 9 (2017) 1063.
19. Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, et al. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocr Metab Immune Disord-Drug Targets* 18 (2018) 4–13.
20. Miloš J, ured. Handbook of Olive Oil: Phenolic Compounds, Production and Health Benefits. New York, Nova Science Publishers Inc, 2017, str. 21-23, 47, 242.
21. Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. Olive Oil Composition. U: Olive Oil: Chemistry and Technology 2nd edition. Boskou D, ured., Champaign, AOCS Press, 2006, str. 41-72.
22. Serreli G, Deiana M. Biological Relevance of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Metabolites. *Antioxidants* 7 (2018) 170.
23. *Food and Drug Administration* - <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-completes-review-qualified-health-claim-petition-oleic-acid-and-risk-coronary-heart-disease> ; pristupljeno 17. ožujka 2020.

24. Guo Z, Jia X, Zheng Z, Lu X, Zheng Y, Zheng B, et al. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochem Rev.* 17 (2018) 1091–1110.
25. Smith AB, Han Q, Breslin PAS, Beauchamp GK. Synthesis and Assignment of Absolute Configuration of (–)-Oleocanthal: A Potent, Naturally Occurring Non-steroidal Anti-inflammatory and Anti-oxidant Agent Derived from Extra Virgin Olive Oils. *Org Lett.* 7 (2005) 5075–5078.
26. Segura-Carretero A, Curiel JA. Current Disease-Targets for Oleocanthal as Promising Natural Therapeutic Agent. *Int J Mol Sci.* 19 (2018) 2899.
27. Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PAS. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437 (2005) 45–46.
28. Chin K-Y, Pang K-L. Therapeutic Effects of Olive and Its Derivatives on Osteoarthritis: From Bench to Bedside. *Nutrients* 9 (2017) 1060.
29. Parkinson L, Keast R. Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 15 (2014) 12323–12334.
30. Pang K-L, Chin K-Y. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients* 10 (2018) 570.
31. Scotece M, Gomez R, Conde J, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Lago F, et al. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: Inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci.* 91 (2012) 1229–1235.
32. *World health organization* - <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> ; pristupljeno 6.6.2020.
33. Rigacci S. Olive Oil Phenols as Promising Multi-targeting Agents Against Alzheimer's Disease. U: Natural Compounds as Therapeutic Agents for Amyloidogenic Diseases. Vassallo N, ured., Berlin, Springer-Verlag Berlin, 2015, str. 1-20.
34. Francisco V, Ruiz-Fernandez C, Lahera V, Lago F, Pino J, Skaltsounis L, et al. Natural Molecules for Healthy Lifestyles: Oleocanthal from Extra Virgin Olive Oil. *J Agric Food Chem.* 67 (2019) 3845–3853.
35. Monti MC, Margarucci L, Tosco A, Riccio R, Casapullo A. New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component. *Food Funct.* 7 (2011) 423–428.
36. Lozano-Castellon J, Lopez-Yerena A, Rinaldi de Alvarenga JF, Romero del Castillo-Alba J, Vallverdu-Queralt A, Escribano-Ferrer E, et al. Health-promoting properties of

- oleocanthal and oleacein: Two secoiridoids from extra-virgin olive oil. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 60 (2019) 2532–2548.
37. Castejon ML, Montoya T, Alarcon-de-la-Lastra C, Sanchez-Hidalgo M. Potential Protective Role Exerted by Secoiridoids from *Olea europaea* L. in Cancer, Cardiovascular, Neurodegenerative, Aging-Related, and Immunoinflammatory Diseases. *Antioxidants* 9 (2020) 149.
 38. Grewal R, Reutzel M, Dilberger B, Hein H, Zotzel J, Marx S, et al. Purified oleocanthal and ligstroside protect against mitochondrial dysfunction in models of early Alzheimer's disease and brain ageing. *Exp Neurol.* 328 (2020) 113248.
 39. Elnagar AY, Sylvester PW, El Sayed KA. (-)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers. *Planta Med.* 77 (2011) 1013–1019.
 40. Akl MR, Ayoub NM, Mohyeldin MM, Busnena BA, Foudah AI, Liu YY, et al. Olive Phenolics as c-Met Inhibitors: (-)-Oleocanthal Attenuates Cell Proliferation, Invasiveness, and Tumor Growth in Breast Cancer Models. *PLoS One* 9 (2014) 97622.
 41. Siddique AB, Kilgore PCSR, Tajmim A, Singh SS, Meyer SA, Jois SD, et al. (-)-Oleocanthal as a Dual c-MET-COX2 Inhibitor for the Control of Lung Cancer. *Nutrients* 12 (2020) 1749.
 42. Torić J, Karković Marković A, Jakobušić Brala C, Barbarić M. Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs. *Acta Pharm.* 69 (2019) 461–482.
 43. Ayoub NM, Siddique AB, Ebrahim HY, Mohyeldin MM, El Sayed KA. The olive oil phenolic (-)-oleocanthal modulates estrogen receptor expression in luminal breast cancer *in vitro* and *in vivo* and synergizes with tamoxifen treatment. *Eur J Pharmacol.* 810 (2017) 100–111.
 44. Siddique AB, Ebrahim HY, Akl MR, Ayoub NM, Goda AA, Mohyeldin MM, et al. (-)-Oleocanthal Combined with Lapatinib Treatment Synergized against HER-2 Positive Breast Cancer *In Vitro* and *In Vivo*. *Nutrients* 11 (2019) 412.
 45. Pei T, Meng Q, Han J, Sun H, Li L, Song R, et al. (-)-Oleocanthal inhibits growth and metastasis by blocking activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7 (2016) 43475–43491.
 46. Gu Y, Wang J, Peng L. (-)-Oleocanthal exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep.* 37 (2017) 483–491.

47. Fogli S, Arena C, Carpi S, Polini B, Bertini S, Digiaco M, Gado F, Saba A, et al. Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. *Nutr Cancer* 68 (2016) 873–877.
48. LeGendre O, Breslin PAS, Foster DA. (-)-Oleocanthal rapidly and selectively induces cancer cell death via lysosomal membrane permeabilization. *MOL CELL ONCOL*. 2 (2015) 10060771–8.
49. Cusimano A, Balasus D, Azzolina A, Augello G, Emma MR, Di Sano C, et al. Oleocanthal exerts antitumor effects on human liver and colon cancer cells through ROS generation. *Int J Oncol*. 51 (2017) 533–544.
50. El Haouari M, Quintero JE, Rosado JA. Anticancer molecular mechanisms of oleocanthal. *Phytother Res*. (2020) 1–15.
51. Naruszewicz M, Czerwinska ME, Kiss AK. Oleacein. Translation from Mediterranean Diet to Potential Antiatherosclerotic Drug. *Curr Pharm Design*. 21 (2015) 1205–1212.
52. Hansen K, Adsersen A, Christensen SB, Jensen SR, Nyman U, Smitt UW. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* 2 (1996) 319-325.
53. Czerwinska M, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chem*. 131 (2012) 940–947.
54. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117 (1995) 25–32.
55. Filipek A, Czerwinska ME, Kiss AK, Polanski JA, Naruszewicz M. Oleacein may inhibit destabilization of carotid plaques from hypertensive patients. Impact on high mobility group protein-1. *Phytomedicine* 32 (2017) 68-73.
56. Franconi F, Campesi I, Romani A. Is Extra Virgin Olive Oil an Ally for Women's and Men's Cardiovascular Health? *Cardiovasc Ther*. 2020 (2020) 6719301.
57. Filipek A, Czerwińska ME, Kiss AK, Wrzosek M, Naruszewicz M. Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. *Phytomedicine* 22 (2015) 1255-1261.
58. Carpi S, Scoditti E, Massaro M, Polini B, Manera C, Digiaco M, et al. The Extra-Virgin Olive Oil Polyphenols Oleocanthal and Oleacein Counteract Inflammation-Related Gene and miRNA Expression in Adipocytes by Attenuating NF-κB Activation. *Nutrients* 11 (2019) 2855.

59. Lepore SM, Maggisano V, Bulotta S, Mignogna C, Arcidiacono B, Procopio A, et al. Oleacein Prevents High Fat Diet-Induced Adiposity and Ameliorates Some Biochemical Parameters of Insulin Sensitivity in Mice. *Nutrients* 11 (2019) 1829.
60. Lombardo GE, Lepore SM, Morittu VM, Arcidiacono B, Colica C, Procopio A, et al. Effects of Oleacein on High-Fat Diet-Dependent Steatosis, Weight Gain, and Insulin Resistance in Mice. *Front Endocrinol.* 9 (2018) 116.
61. Poini B, Digiacocono M, Carpi S, Bertini S, Gado F, Saccomanni G, et al. Oleocanthal and oleacein contribute to the in vitro therapeutic potential of extra virgin oil-derived extracts in non-melanoma skin cancer. *Toxicol Vitro.* 52 (2018) 243–250.
62. Juli G, Oliverio M, Bellizzi D, Cantafio MEG, Grillone K, Passarino G, et al. Anti-tumor Activity and Epigenetic Impact of the Polyphenol Oleacein in Multiple Myeloma. *Cancers* 11 (2019) 990.
63. Atkins P, de Paula J. Physical chemistry for the Life Sciences. Oxford, Oxford University Press, 2006, str. 604-607.
64. Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 146-148.
65. Atkins P, de Paula J, Keeler J. Atkins' Physical Chemistry, 11th edition. Oxford, Oxford University Press, 2018, str. 488-490.
66. Carbajo RJ, Neira JL. NMR for Chemists and Biologists. Springer Netherlands, 2013, str 2-5, 12, 23.
67. 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.* 100 (2020) 1842–1851.
68. Hatzakis E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 18 (2019) 189–220.
69. Castejon D, Fricke P, Isabel Cambero M, Herrera A. Automatic ^1H -NMR Screening of Fatty Acid Composition in Edible Oils. *Nutrients* 8 (2016) 93.
70. Sacchi R, Addeo F, Paolillo L. ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magn Reson Chem.* 35 (1997) S133-S145.
71. Jiang XY, Li C, Chen QQ, Weng XC. Comparison of ^{19}F and ^1H NMR spectroscopy with conventional methods for the detection of extra virgin olive oil adulteration. *Grasas aceites* 69 (2018) e249.

72. Rongai D, Sabatini N, Del Coco L, Perri E, Del Re P, Simone N, et al. ^1H NMR and Multivariate Analysis for Geographic Characterization of Commercial Extra Virgin Olive Oil: A Possible Correlation with Climate Data. *Foods* 6 (2017) 96.
73. Merchak N, El Bacha E, Khouzam RB, Rizk T, Akoka S, Bejjani J. Geoclimatic, morphological, and temporal effects on Lebanese olive oils composition and classification: A ^1H NMR metabolomic study. *Food Chem.* 217 (2017) 379–388.
74. S. Ok. Fast screening of turkish olive oil by NMR spectroscopy for geographical determination and discrimination purposes. *Grasas aceites* 65 (2014) 024.
75. 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.* 60 (2012) 11696–11703.
76. 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.* 62 (2014) 600–607.
77. Mansour AB, Gargouri B, Melliou E, Magiatis P, Bouaziz M. Oil quality parameters and quantitative measurement of major secoiridoid derivatives in Neb Jmel olive oil from various Tunisian origins using qNMR. *J Sci Food Agric.* 96 (2016) 4432–4439.
78. López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Tresserra-Rimbau A, Quifer-Rada P, Jiménez B, Pérez M, Vallverdú-Queralt A. Effects of Organic and Conventional Growing Systems on the Phenolic Profile of Extra-Virgin Olive Oil. *Molecules* 24 (2019) 1986.
79. 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* 25 (2020) 2449.
80. Bilušić T, Žanetić M, Ljubenković I, Generalić Mekinić I, Štambuk S, Bojović V, Soldo B, Magiatis P. Molecular characterization of Dalmatian cultivars and the influence of the olive fruit harvest period on chemical profile, sensory characteristics and oil oxidative stability. *Eur Food Res Technol* 244 (2017) 281–289.
81. 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.

82. Rosillo M, Alarcón-de-la-Lastra C, Castejón M, Montoya T, Cejudo-Guillén M, Sánchez-Hidalgo M. Polyphenolic extract from extra virgin olive oil inhibits the inflammatory response in IL-1 β -activated synovial fibroblasts. *Br J Nutr.* 121 (2019) 55–62.
83. Segura Palacios JM, Blázquez Sánchez N, Rivas Ruiz F, Aguilar Bernier M, Ramírez López B, Sánchez MEF, et al. Topical treatment with oleocanthal extract in reducing inflammatory reactions after photodynamic therapy: a prospective quasi-experimental pilot study. *Complement Ther Med.* 42 (2019) 298–301.
84. Goren L, Zhang G, Kaushik S, Breslin PAS, Du Y-CN, Foster DA. (-)-Oleocanthal and (-)-oleocanthal-rich olive oils induce lysosomal membrane permeabilization in cancer cells. *PLoS One* 14 (2019) e0216024.
85. *EUR-Lex* - <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0432&from=EN> ; pristupljeno 15.8.2020.
86. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 132 (2018) 41–48.
87. Saini RK, Keum Y-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. *Life Sci.* 203 (2018) 255–267.
88. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal Chem.* 23 (2004) 535-552.
89. Soinen P. 2008. Quantitative ^1H NMR Spectroscopy. University of Kuopio.
90. <https://nmr.chem.ucsb.edu/protocols/fast1pulse.html> ; pristupljeno 14.6.2020.
91. Amin N, Claridge T. 2017. Quantitative NMR Spectroscopy. University of Oxford.
92. *Chemistry LibreTexts* - [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Quantitative_NMR/03_Practical_Aspects_of_Quantitative_NMR/04._How_do_I_choose_the_right_acquisition_parameters_for_a_quantitative_NMR_measurement%3F](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Quantitative_NMR/03_Practical_Aspects_of_Quantitative_NMR/04._How_do_I_choose_the_right_acquisition_parameters_for_a_quantitative_NMR_measurement%3F); pristupljeno 5.8.2020.
93. Dutta Majumdar, Rudraksha. 2015. A nuclear magnetic resonance spectroscopic investigation of the molecular structure and aggregation behavior of asphaltenes. University of Lethbridge.

94. *MSU chemistry* –
<https://www2.chemistry.msu.edu/facilities/nmr/handouts/Locking.pdf> ; pristupljeno 5.8.2020.
95. *Magritek* – <https://magritek.com/2014/08/12/the-lock-and-the-importance-of-field-stability/> ; pristupljeno 5.8.2020.
96. Alvarado E. 2010. Practical guide for quantitative 1D NMR integration. University of Michigan.
97. *The Human Metabolome Database* - <https://hmdb.ca/> ; pristupljeno 13.8.2020.

8. SAŽETAK

Kvantitativna ¹H NMR analiza sekoiridoidnih fenolnih spojeva i masnih kiselina u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline

Azra Kugić

Povećana incidencija kroničnih i neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starijom životnom dobi i sjedilačkim načinom života uvelike pridonosi smanjenju kvalitete života. Maslinovo ulje, kao glavni izvor masti u tzv. mediteranskoj prehrani, prepoznato je kao jedan od ključnih faktora u promicanju „zdravog starenja“ (engl. *healthy ageing*). Blagotvoran i protektivan učinak maslinovog ulja na zdravlje pripisuje se njegovom povoljnom sastavu masnih kiselina i biološki aktivnih fenolnih spojeva. Posebna pažnja pridaje se sekoiridoidnim fenolnim spojevima specifičnim za maslinovo ulje poput oleokantala i oleaceina koji su posljednjih godina u fokusu brojnih znanstvenih istraživanja. Oleokantal je poznat kao prirodni nesteroidni protuupalni lijek s COX-1 i COX-2 inhibitorskim učinkom usporedivim s ibuprofenom, a ističe se i svojim antireumatskim, antitumorskim i neuroprotektivnim učincima. Pored toga, oleacein je prepoznat kao molekula iznimnih kardioprotektivnih, protuupalnih i antitumorskih svojstava. Iz tog razloga, prepoznavanje maslinovih ulja koja su posebno bogata navedenim fenolnim spojevima od značajne je važnosti. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijal maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline određivanjem sadržaja sekoiridoidnih fenolnih spojeva, kao i udjela masnih kiselina, primjenom ¹H NMR spektroskopije. Provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz maslinovog ulja te je kvantitativno određen sadržaj oleokantala i oleaceina te polu-kvantitativno sadržaj oleuropein i ligstrozid aglikona i masnih kiselina: oleinske, linolne, α-linolenske i palmitinske kiseline. Analizirano je sedam maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline, Bjelica, Buža, Žižolera i Oblica. Utvrđeno je da sva ispitana ulja predstavljaju vrijedan izvor sekoiridoidnih fenolnih spojeva te da njihov sadržaj znatno varira ovisno o sorti masline. Oleokantalom se pokazalo najbogatije ulje sorte Oblica (Ugljan), dok su nešto niže koncentracije zabilježene u sortama Bjelica (Istra) i Žižolera, Oleum Maris (Istra). Iznimno visoka koncentracija oleaceina u usporedbi s podacima u literaturi zabilježena je u sorti Oblica (Ugljan), a nešto niži sadržaj utvrđen je u sortama Žižolera, Oleum Maris (Istra) i Oblica-slano (Ugljan). Čuvanje plodova masline u moru prije prerade u ulje dovelo je do značajnog smanjenja sadržaja ispitanih sekoiridoidnih fenolnih spojeva. U sklopu daljnjih istraživanja koja prelaze okvire ovog rada planiraju se ispitati biološki učinci fenolnih ekstrakata maslinovih ulja i povezanost utvrđene aktivnosti sa sadržajem ispitanih sekoiridoidnih fenolnih spojeva.

Ključne riječi: maslinovo ulje, oleokantal, oleacein, masne kiseline, NMR spektroskopija

9. SUMMARY

Quantitative ^1H NMR analysis of secoiridoid phenolic compounds and fatty acids in autochthonous Croatian olive oils

Azra Kugić

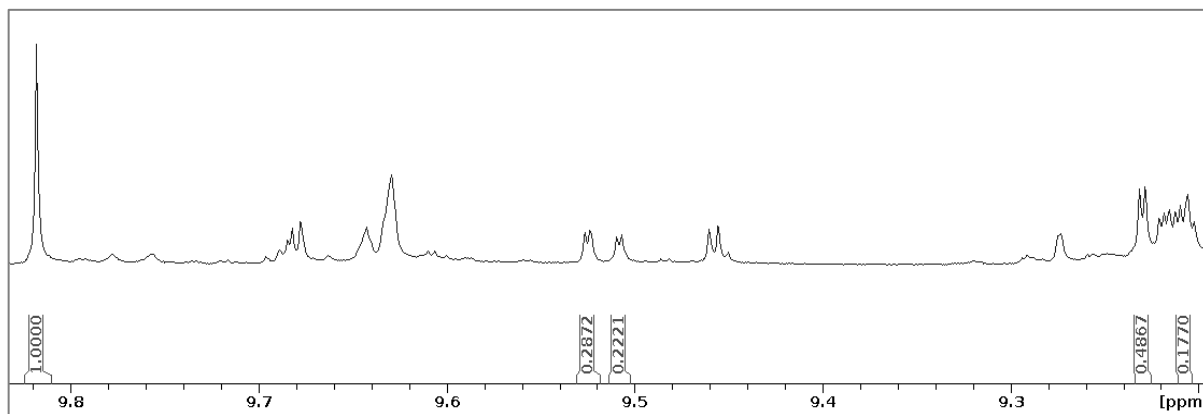
The increased incidence of chronic and neurodegenerative diseases associated with older age and sedentary lifestyle greatly contributes to the reduction of quality of life. As the main source of fat in the so-called Mediterranean diet, olive oil is recognized as one of the key factors in promoting „healthy aging“. The beneficial and protective effect of olive oil on health is attributed to its favorable composition of fatty acids and bioactive phenolic compounds. Particular attention is paid to secoiridoid phenolic compounds specific for olive oil such as oleocanthal and oleacein, which have been the focus of numerous scientific studies in recent years. Oleocanthal is known as a natural non-steroidal anti-inflammatory drug with COX-1 and COX-2 inhibitory effect comparable to ibuprofen, and it also stands out for its antirheumatic, antitumor and neuroprotective effects. In addition, oleacein has been recognized as a molecule of exceptional cardioprotective, anti-inflammatory and antitumor properties. For this reason, the identification of olive oils that are particularly rich in these phenolic compounds is of significant importance. The aim of this study was to examine the potential of olive oils of autochthonous Croatian olive varieties by determining the content of secoiridoid phenolic compounds, as well as the content of fatty acids, using ^1H NMR spectroscopy. Extraction of phenolic compounds from olive oil was performed and the content of oleocanthal and oleacein was determined, as well as the semiquantitative content of oleuropein and ligstroside aglycones and fatty acids: oleic, linoleic, α -linolenic and palmitic acids. Seven olive oils of autochthonous Croatian olive varieties, Bjelica, Buža, Žižolera and Oblica, were analyzed. All examined oils were found to be a valuable source of secoiridoid phenolic compounds and their content varied considerably. The highest concentration of oleocanthal was found in olive oil of the Oblica variety (Ugljan), while slightly lower concentrations were recorded in Bjelica (Istria) and Žižolera, Oleum Maris (Istria) varieties. Extremely high concentrations of oleacein compared to the literature data were recorded in the Oblica (Ugljan) variety, while a slightly lower content was found in Žižolera, Oleum Maris (Istria) and Oblica-sea (Ugljan) varieties. Storing olive fruit in the sea before processing it into oil led to a significant reduction in the content of analyzed secoiridoid phenolic compounds. As part of further research that goes beyond the scope of this paper, it is planned to examine the biological effects of phenolic extracts of olive oils and the relationship of the determined activity with the content of secoiridoid phenolic compounds.

Key words: olive oil, oleocanthal, oleacein, fatty acids, NMR spectroscopy

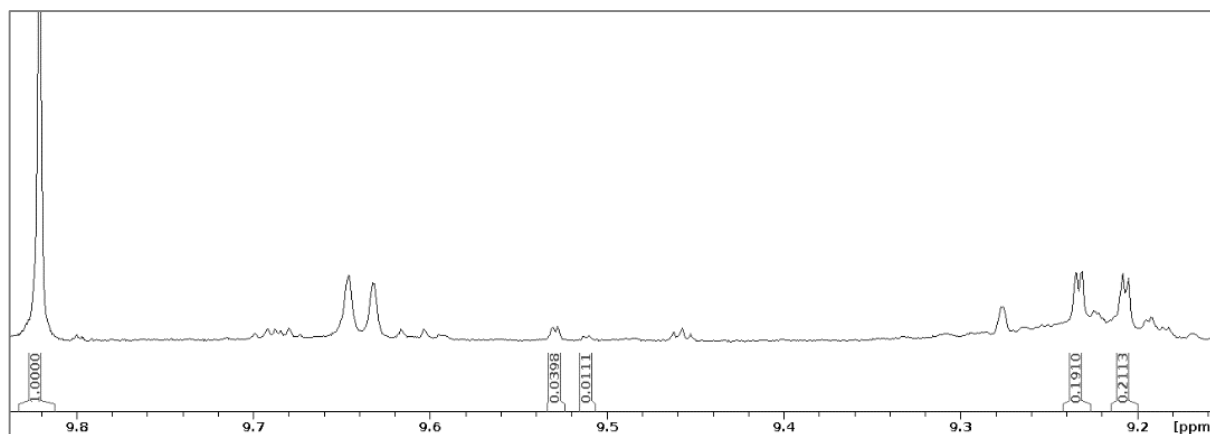
PRILOZI

Prilozi sadrže ^1H NMR spektre ispitanih ulja i njihovih fenolnih ekstrakata te UV-VIS spektre oleokantala, oleaceina i siringaldehida.

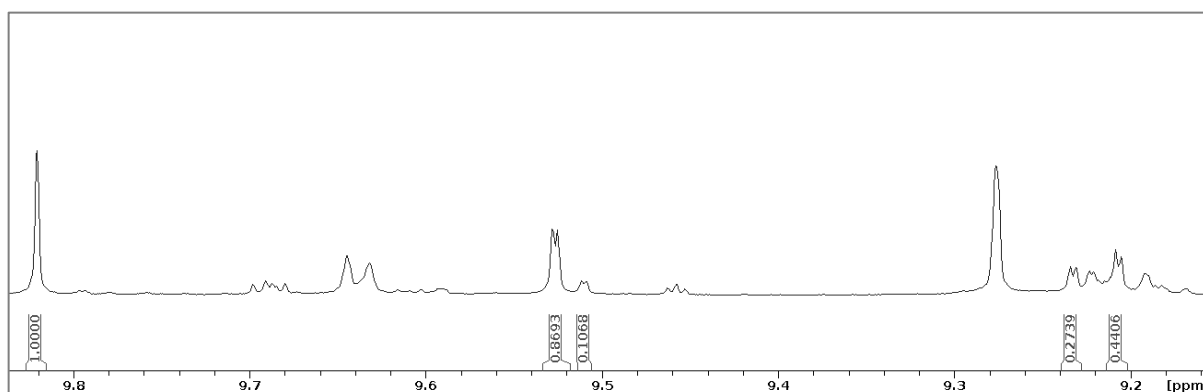
Prilog 1. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Bjelica (Istra).



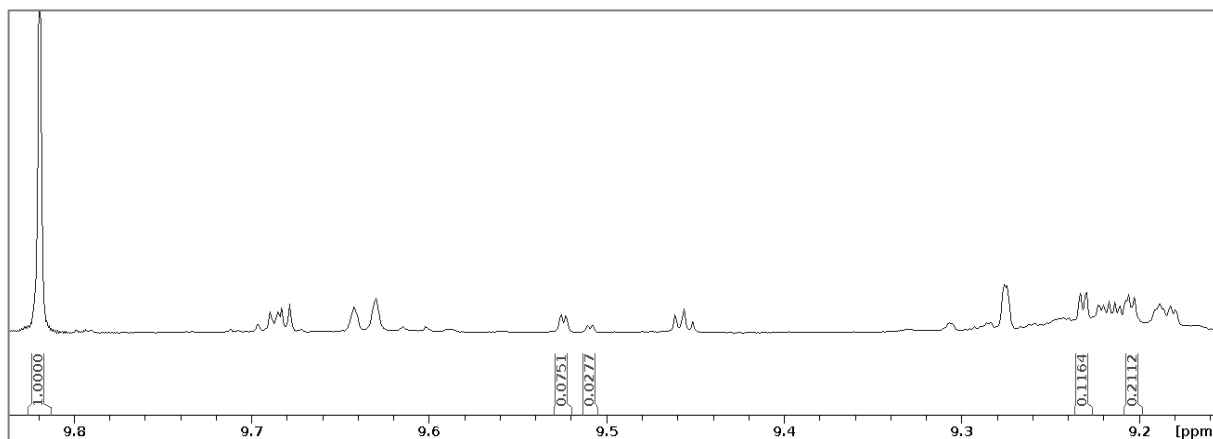
Prilog 2. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Buža (Istra).



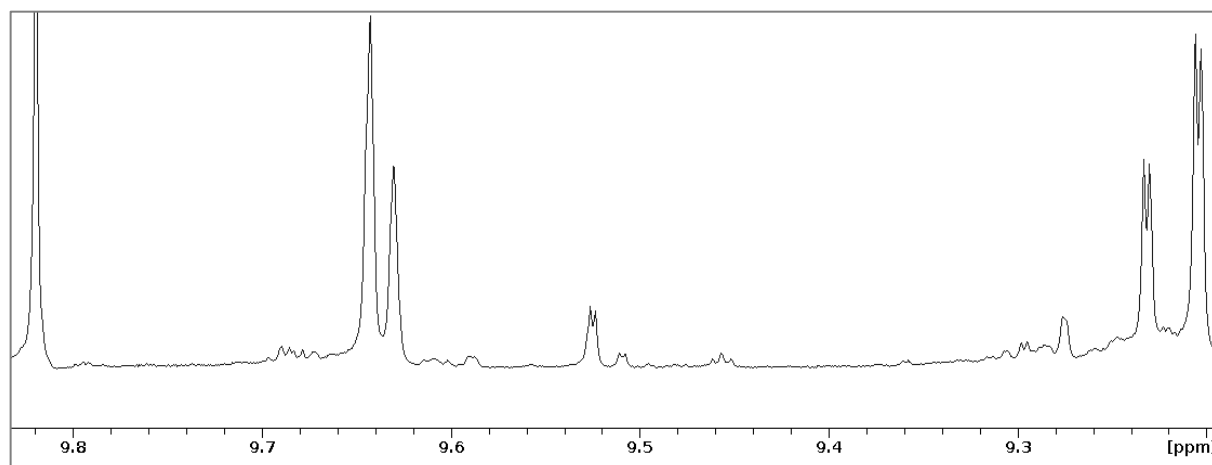
Prilog 3. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Žižolera, Oleum Maris (Istra).



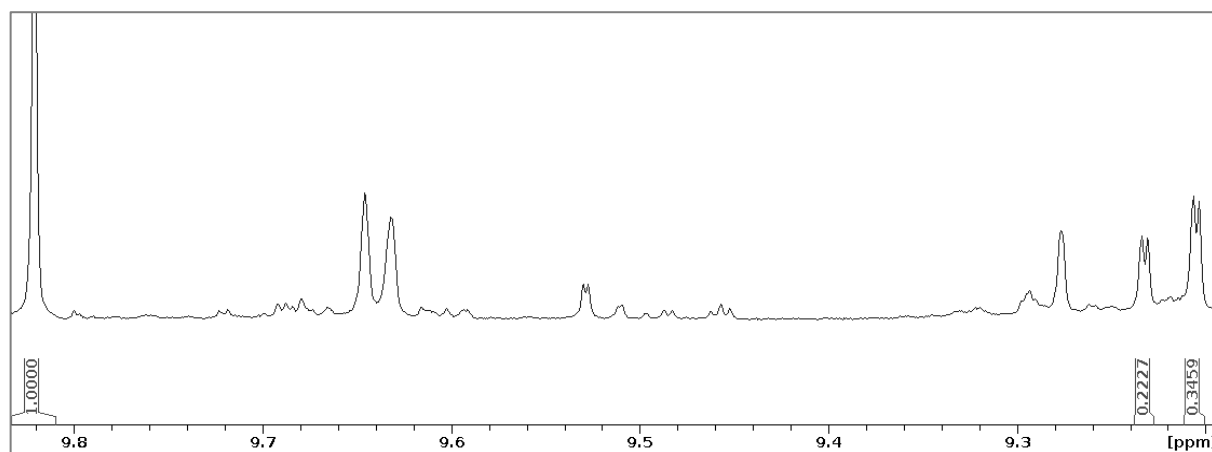
Prilog 4. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Žizolera, Meloto (Istra).



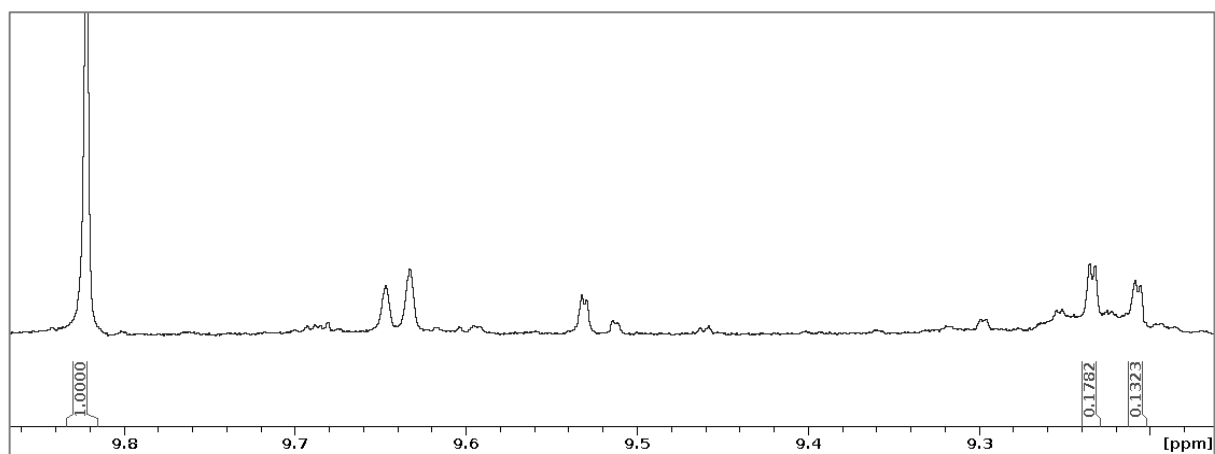
Prilog 5. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Oblica (Ugljan).



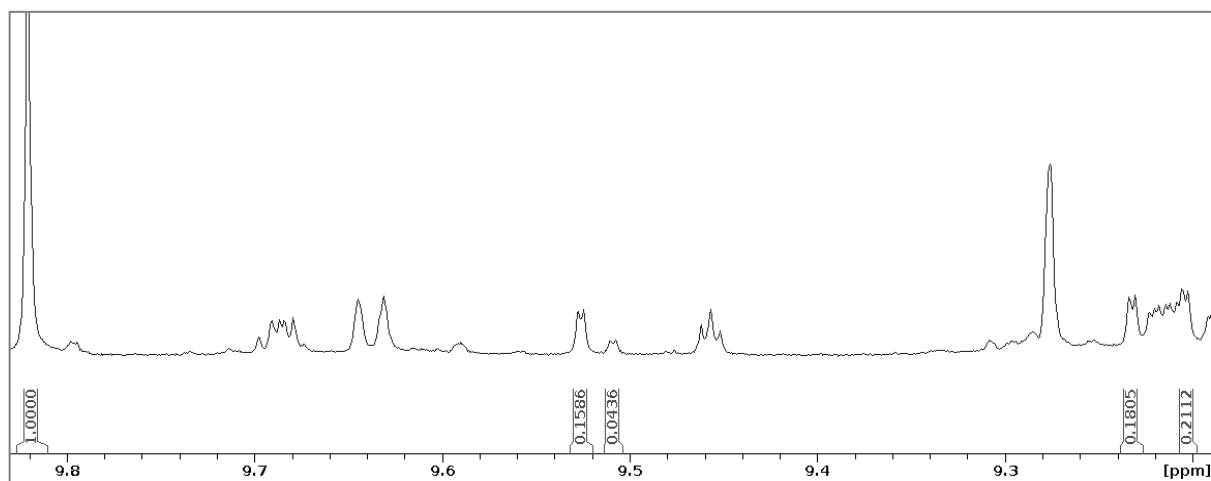
Prilog 6. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Oblica-slano (Ugljan).



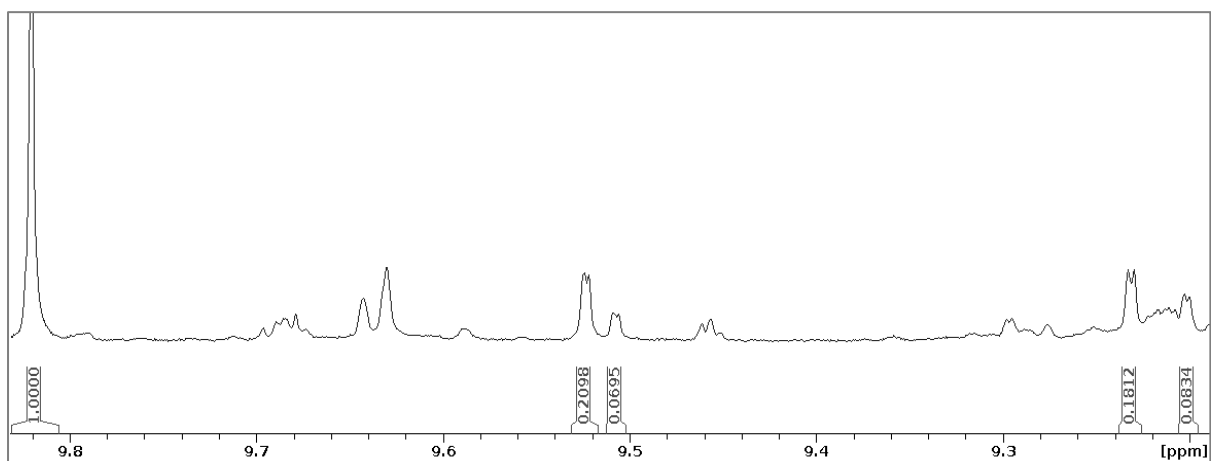
Prilog 7. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja sorte Oblica (Dubrovnik).



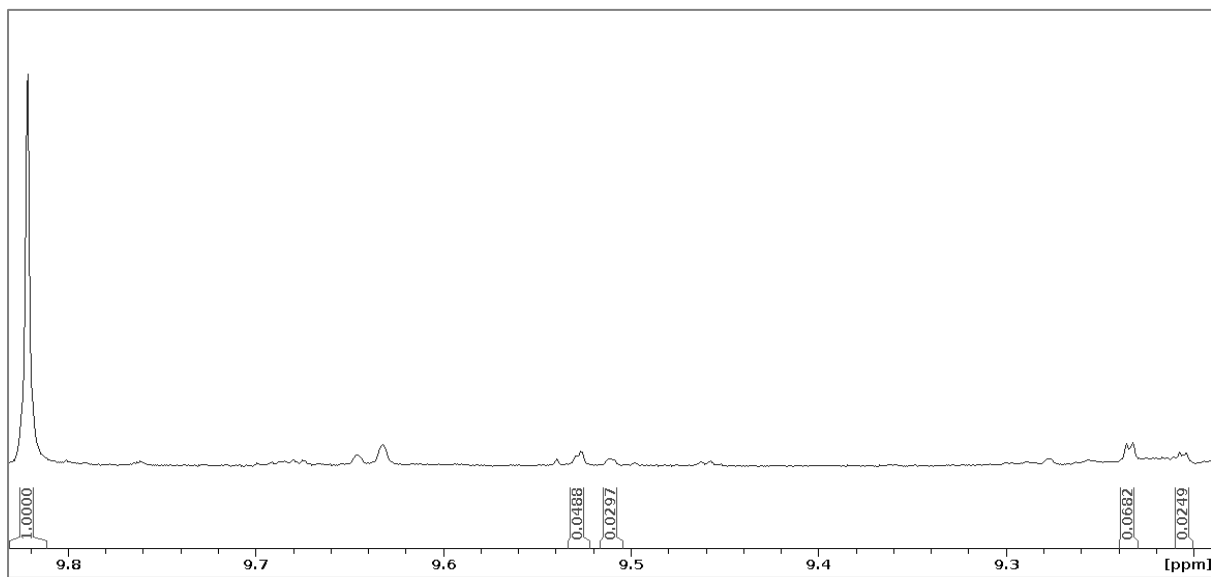
Prilog 8. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja *Zvijezda*.



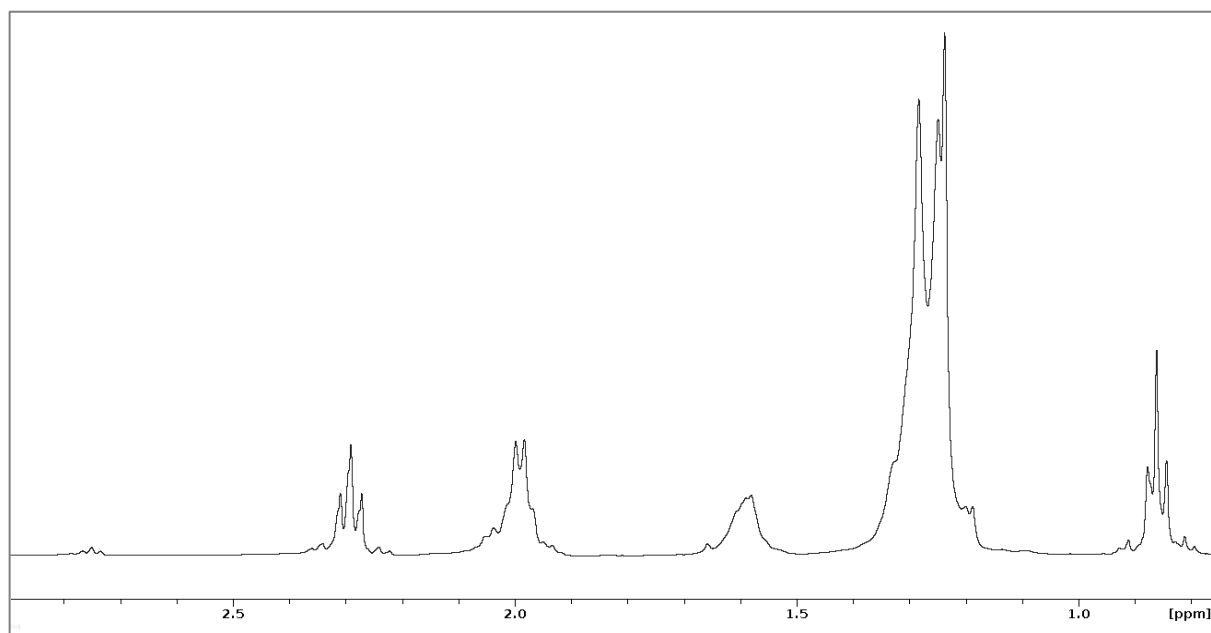
Prilog 9. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja *Despar*.



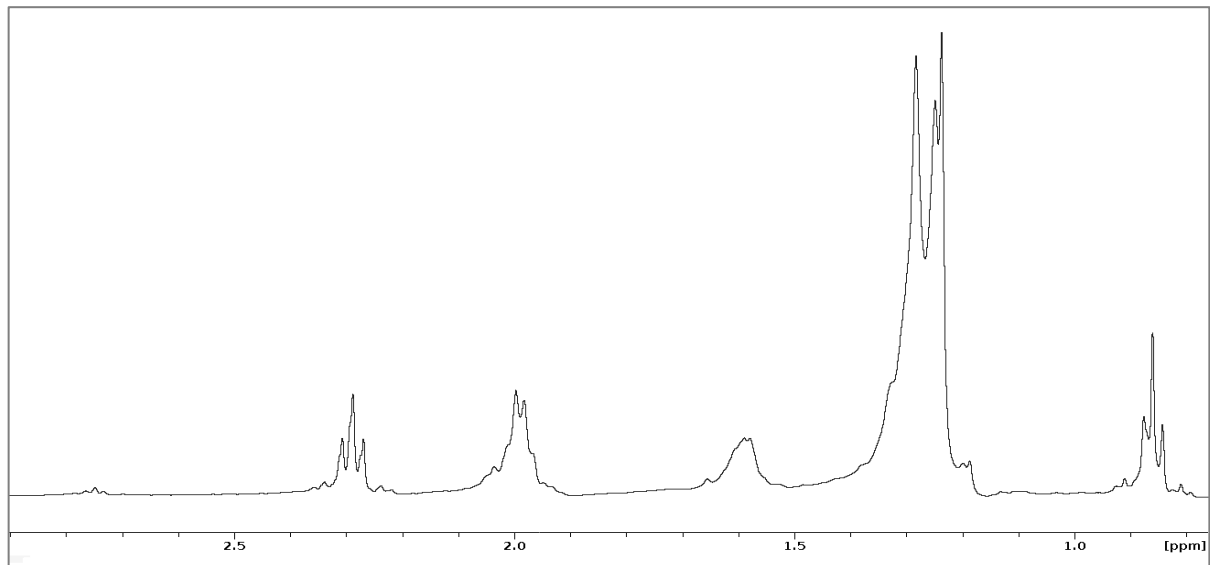
Prilog 10. ^1H NMR spektar fenolnog ekstrakta maslinovog ulja *Trenton*.



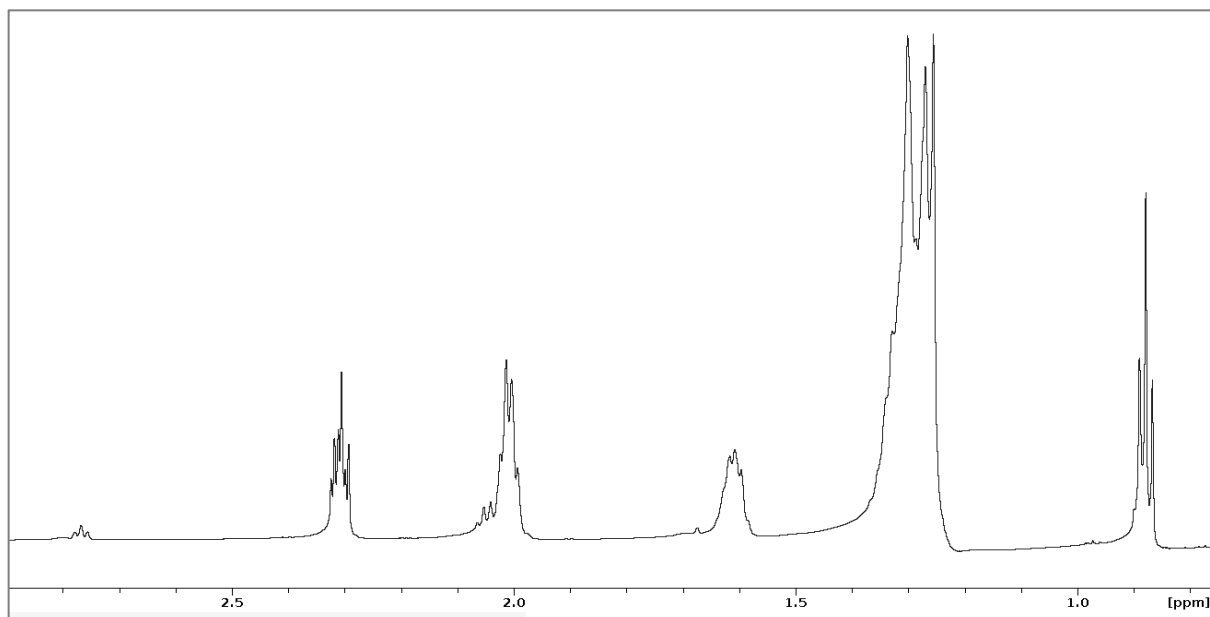
Prilog 11. ^1H NMR spektar maslinovog ulja sorte Bjelica (Istra).



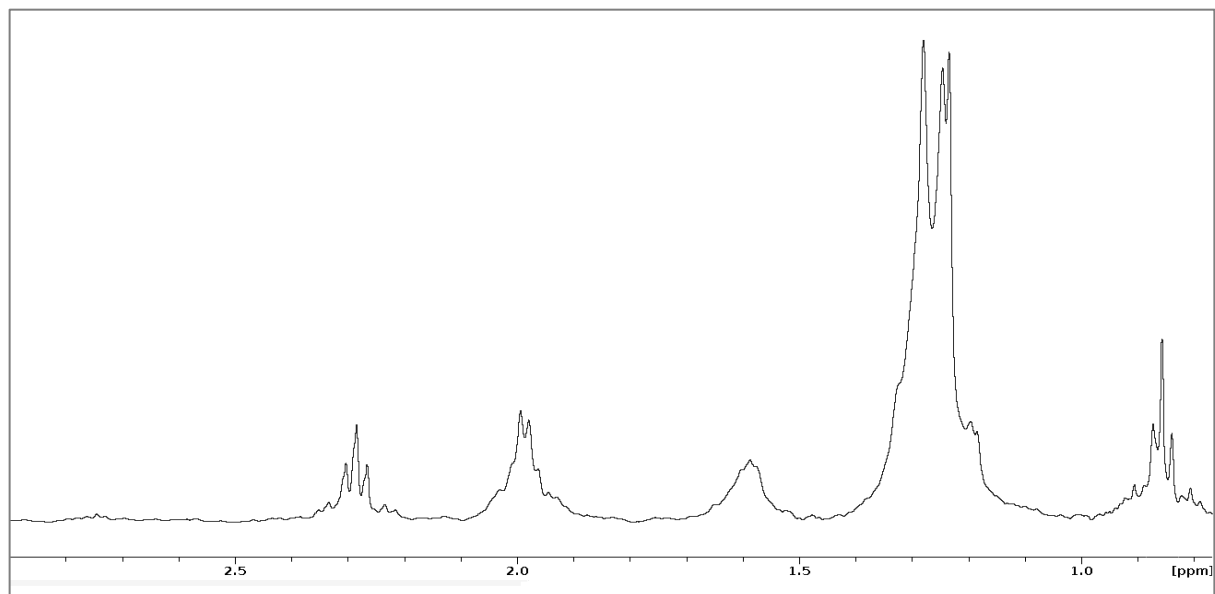
Prilog 12. ^1H NMR spektar maslinovog ulja sorte Buža (Istra).



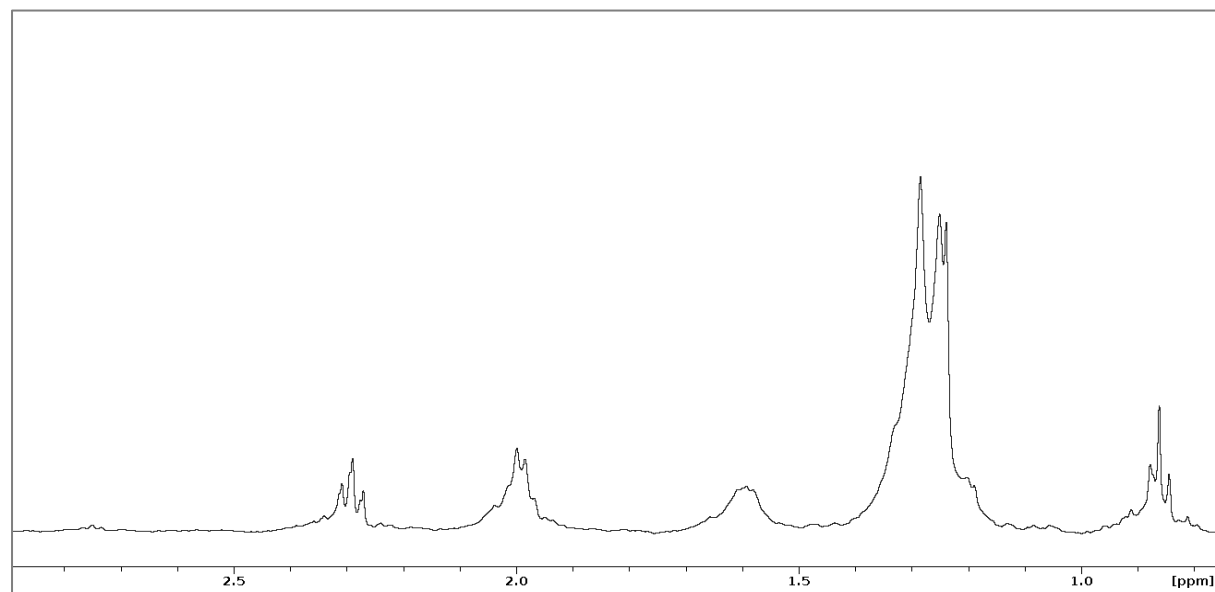
Prilog 13. ^1H NMR spektar maslinovog ulja sorte Žižolera, Oleum Maris (Istra).



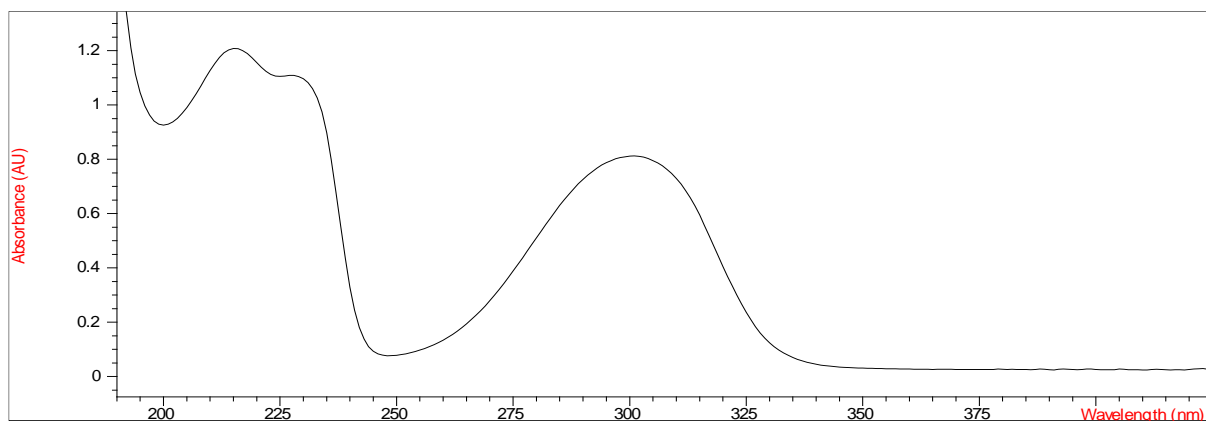
Prilog 14. ^1H NMR spektar maslinovog ulja sorte Žižolera, Meloto (Istra).



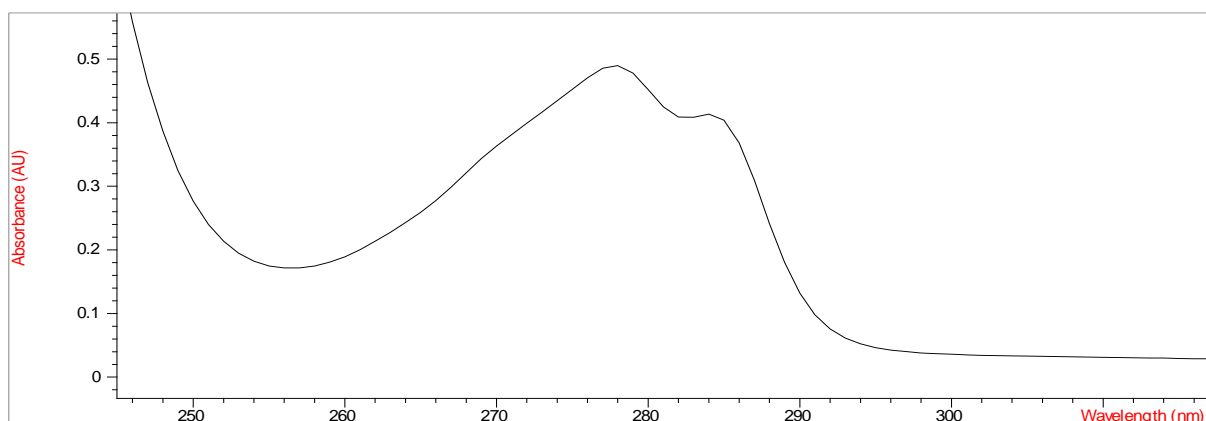
Prilog 15. ^1H NMR spektar maslinovog ulja sorte Oblica (Ugljan).



Prilog 16. UV-Vis spektar $2,79 \times 10^{-6}$ M otopine siringaldehida u acetonitrilu.



Prilog 17. UV-Vis spektar 0,00012 M otopine oleokantala u acetonitrilu.



Prilog 18. UV-Vis spektar 0,00017 M otopine oleaceina u acetonitrilu.

