

# UVJETI PROVOĐENJA FAST BLUE BB TESTA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U DJEVIČANSKOM MASLINOVOM ULJU

---

**Marković, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:973258>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Marija Marković

**UVJETI PROVOĐENJA FAST BLUE BB TESTA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH  
FENOLA U DJEVIČANSKOM MASLINOVOM ULJU**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Marija Marković

**UVJETI PROVOĐENJA FAST BLUE BB TESTA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH  
FENOLA U DJEVIČANSKOM MASLINOVOM ULJU**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: **izv. prof. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.**

Diplomski rad obranjen je dana **13. srpnja 2023.** na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Dalibor Broznić, dipl. sanit. ing. (predsjednik Povjerenstva)
2. prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.
3. izv. prof. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 40 stranica, 12 slika, 5 tablica i 41 literaturni navod.

## **Zahvala**

*Prije svega, zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Valeriji Majetić Germek, dipl. sanit. ing. na neizmjernej pomoći koju mi je pružila, nesebično uloženom trudu i vremenu, podršci, strpljenju, izuzetnom vodstvu te udijeljenim savjetima i znanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Oliveri Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh. na savjetima, sugestijama i pruženoj pomoći tijekom cijele izrade diplomskog rada te laborantici Ireni Ugljar, bacc. ing. agr. na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Naposljetku, zahvaljujem se mojoj majci i sestrama na neizmjernej ljubavi, podršci i razumijevanju koju su mi pružile tijekom cijelog obrazovanja!*

# UVJETI PROVOĐENJA FAST BLUE BB TESTA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U DJEVIČANSKOM MASLINOVOM ULJU

## SAŽETAK

U ovom su radu istraženi različiti uvjeti provođenja *Fast Blue BB* testa za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola izravno na djevičanskom maslinovom ulju. Kombinirane su različite tehnike miješanja uzoraka ulja s *Fast Blue BB* reagensom u alkalnom pH (miješanje na horizontalnoj tresilici, vorteksiranje i reakcija u ultrazvučnoj kupelji) s različitim vremenom trajanja (10, 20 i 30 minuta). Iako se najviši maseni udio fenola dobiva reakcijom u ultrazvučnoj kupelji kroz 20 minuta (420,4 mg/kg), kao najprikladnije je odabrano vorteksiranje u trajanju 20 minuta (364,1 mg/kg) zbog praktičnosti izvedbe. Maseni udjeli ukupnih fenola i vode u svim monosortnim industrijski filtriranim (na filtarskoj preši) djevičanskim maslinovim uljima niži su od onih u uljima izbistrenim prirodnim dekantiranjem. Samo su kod ulja sorte Leccino te razlike i statistički značajne (za 4,7% niži udio ukupnih fenola te za 27% niži udio vode u odnosu na prirodno dekantirano ulje). Provjerom stabilnosti etanolne otopine *Fast Blue BB* reagensa čuvane u hladnjaku (4 °C) i zamrzivaču (-20 °C) 30 dana, utvrđeno je da je *Fast Blue BB* reagens prihvatljivo čuvati do pet dana u hladnjaku, budući da se nakon reakcije s kavskom kiselinom apsorbancije kod čuvanja u hladnjaku smanjuju za 3%, a kod čuvanja u zamrzivaču za 5%.

**Ključne riječi:** fenoli, *Fast Blue BB* test, djevičansko maslinovo ulje, filtracija

# THE FAST BLUE BB ASSAY CONDITIONS FOR THE DETERMINATION OF TOTAL PHENOLS IN VIRGIN OLIVE OIL

## SUMMARY

In this study, different conditions for conducting the Fast Blue BB assay for the spectrophotometric determination of total phenols directly on virgin olive oil were investigated. Different techniques for mixing oil samples with the Fast Blue BB reagent in alkaline pH were combined (mixing on a horizontal shaker, vortexing and reaction in an ultrasonic bath) with different durations (10, 20 and 30 minutes). Although the highest mass fraction of phenols was obtained after the 20-minute reaction in the ultrasonic bath (420.4 mg/kg), the 20-minute vortexing (364.1 mg/kg) was chosen as the most acceptable and practical for further application. Mass fractions of total phenols and water in all monovarietal industrially filtered (with a filter press) virgin olive oils are lower than those in oils clarified by natural decantation. These differences are statistically significant only in Leccino oil (mass fraction of total phenols 4.7% lower and water content 27% lower than in naturally decanted oils). The study of the stability of the ethanol solution of the Fast Blue BB reagent stored for 30 days in the refrigerator (4 °C) and in the freezer (-20 °C) showed that the storage of the Fast Blue BB reagent for up to five days in the refrigerator is acceptable, as absorbance values after reaction with caffeic acid decreased by 3% and 5% during storage in the refrigerator and freezer, respectively.

**Key words:** phenols, Fast Blue BB test, virgin olive oil, filtration

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	2
2.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost djevičanskog maslinovog ulja .....	2
2.2. Fenolne tvari u djevičanskom maslinovom ulju.....	4
2.2.1. Biološka aktivnost i potencijalni zdravstveni učinci fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja.....	6
2.3. Metode određivanja fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom ulju .....	7
2.4. Karakteristike <i>Fast Blue BB</i> testa.....	8
2.5. Filtracija djevičanskog maslinovog ulja i utjecaj na fenolne tvari .....	9
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	12
<b>4. MATERIJALI I POSTUPCI</b> .....	13
<b>4.1. MATERIJALI</b> .....	13
4.1.1. Uzorci djevičanskog maslinovog ulja .....	13
4.1.2. Kemikalije i reagensi .....	13
4.1.3. Uređaji i pribor.....	13
<b>4.2. POSTUPCI</b> .....	15
4.2.1. Priprema <i>Fast Blue BB</i> otopine za određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinom ulju.....	15
4.2.2. Uvjeti provođenja i određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinom ulju <i>Fast Blue BB</i> testom.....	15
4.2.3. Kvantifikacija fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom ulju primjenom vanjskog standarda .....	16
4.2.4. Ispitivanje stabilnosti otopine <i>Fast Blue BB</i> reagensa.....	18
4.2.5. Određivanje udjela vode u ulju .....	18
4.2.6. Statistička obrada rezultata .....	19



<b>5. REZULTATI</b> .....	20
5.1. Rezultati ispitivanja različitih kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja kod <i>Fast Blue BB</i> testa za određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinovom ulju .....	20
5.2. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopine <i>Fast Blue BB</i> reagensa .....	21
5.3. Rezultati primjene odabrane kombinacije tehnike i trajanja emulgiranja kod <i>Fast Blue BB</i> testa na sortnim djevičanskim maslinovim uljima.....	22
5.4. Udio vode u sortnim djevičanskim maslinovim uljima.....	23
<b>6. RASPRAVA</b> .....	24
6.1. Utjecaj kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja kod provođenja <i>Fast Blue BB</i> testa na ukupne fenole djevičanskog maslinovog ulja .....	24
6.2. Stabilnost otopine <i>Fast Blue BB</i> reagensa .....	26
6.3. Utjecaj filtracije sortnih djevičanskih maslinovih ulja na ukupne fenole.....	26
6.4. Udio vode u sortnim djevičanskim maslinovim uljima.....	27
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	29
<b>8. LITERATURA</b> .....	31
<b>9. PRILOZI</b> .....	36
<b>10. POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA</b> .....	37
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	38
<b>POPIS SLIKA</b> .....	39
<b>POPIS TABLICA</b> .....	40

# 1. UVOD

Za razliku od većine biljnih ulja, djevičansko maslinovo ulje (DMU) se dobiva mehaničkom ekstrakcijom uglavnom iz pulpe ploda masline (*Olea europea L.*) te manjim dijelom iz sjemenke ploda (Boskou, 2006). Dobiveno ulje jedinstvenog je sastava i specifičnog okusa i mirisa te se zbog toga može konzumirati izravno nakon ekstrakcije (Šarolić i sur., 2014). Ovisno o fizikalno-kemijskim i senzorskim svojstvima, maslinovo ulje se klasificira u različite kategorije kvalitete. Unutar DMU, ekstra DMU je ulje najviše kvalitete, s niskim udjelom slobodnih masnih kiselina, koji ukazuje da je ulje dobiveno od zdravih maslina koje su prerađene u kratkom roku nakon branja (Uredba 1308/2013). Biološka, nutritivna i zdravstvena svojstva DMU znanstveno su utemeljena te se zbog toga bilježi porast konzumacije DMU u cijelom svijetu. DMU ima blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje zahvaljujući specifičnom kemijskom sastavu, tj. visokom sadržaju nezasićenih masnih kiselina i visokom sadržaju prirodnih antioksidansa (Jimenez-Lopez i sur., 2020; Šarolić i sur., 2014).

Fenolne tvari DMU, zaslužne su za mnoge učinke na ljudsko zdravlje koji su uglavnom povezani s njihovim antioksidativnim svojstvima. Udio fenolnih tvari u DMU može varirati od 50 do 1000 mg/kg ulja ovisno o sorti masline, procesu ekstrakcije ulja i uvjetima skladištenja ulja. Doprinosе karakterističnoj voćnosti, gorčini, pikantnosti i trpkosti DMU, kao i oksidacijskoj stabilnosti. Stoga, podatak o udjelu fenolnih tvari pruža vrijednu informaciju o nutritivnoj, kemijskoj i senzorskoj kvaliteti DMU (Siano i sur., 2022; Boskou, 2009). U označavanju DMU može se koristiti zdravstvena tvrdnja „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa.“, kada ulje sadrži najmanje 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropein i verbaskozid) u 20 g ulja, tj. najmanje 250 mg/kg ulja (Uredba 432/2012). Pokazalo se da se ova zdravstvena tvrdnja nedovoljno koristi. Jedan od mogućih razloga za to je nedostatak jednostavne metode za određivanje i kvantificiranje fenolnih spojeva (Siano i sur., 2022).

U ovom radu ispitano je nekoliko kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* testa za određivanje ukupnih fenola u DMU. Test se ističe svojom jednostavnošću, brzinom, pouzdanošću i niskom cijenom u odnosu na dosad korištene metode za kvantifikaciju fenolnih spojeva u DMU.

## 2. PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost djevičanskog maslinovog ulja

DMU su hladno prešana ulja iznimne nutritivne vrijednosti zahvaljujući specifičnom kemijskom sastavu. Osobito se ističe visoka zastupljenost oleinske masne kiseline te hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa.

DMU sadrži osapunjivu i neosapunjivu frakciju. Osapunjivu frakciju uglavnom čine triacilgliceroli, diacilgliceroli, monoacilgliceroli, slobodne masne kiseline, fosfolipidi i voskovi, a oni čine od 98,5% do 99,5% sastava ulja. Neosapunjiva frakcija sastoji se od ugljikovodika, fenolnih spojeva, tokoferola, sterola, pigmenta i hlapljivih spojeva koji čine oko 0,5% do 1,5% sastava ulja (Šarolić i sur., 2014).

Triacilgliceridi u svom sastavu sadrže masne kiseline. U DMU najzastupljenije masne kiseline su nezasićene masne kiseline od kojih prevladava jednostruko nezasićena oleinska masna kiselina. Njezin udio u sastavu masnih kiselina DMU može biti u rasponu od 55% do 85% i jedan je od pokazatelja autentičnosti DMU (Uredba 2022/2104). Oleinska kiselina uvelike doprinosi biološkoj i nutritivnoj vrijednosti DMU, kao i prisutnost višestruko nezasićenih masnih kiselina poput linolne i  $\alpha$ -linolenske masne kiseline. Visok udio oleinske kiseline, koja je otpornija prema oksidaciji od višestruko nezasićenih masnih kiselina, u kombinaciji s visokim udjelom fenolnih tvari osigurava stabilnost DMU prema oksidaciji. Udio zasićenih masnih kiselina (uglavnom palmitinske i stearinske) u DMU je manji i iznosi oko 14% od ukupnih masnih kiselina. Ovakav sastav masnih kiselina povezan je sa zaštitnim učincima od koronarnih i autoimunih bolesti, prevencijom tromboze te regulacijom krvnog tlaka (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

Sastav masnih kiselina u DMU je različit i uvjetovan raznim čimbenicima. Najveći utjecaj na sastav masnih kiselina u DMU imaju genetski čimbenici tj. sorta masline, te meteorološki uvjeti uzgoja (Klepo i Benčić, 2014; Koprivnjak i sur., 2012). Sastav masnih kiselina u sortnim DMU istraživanim u ovom radu prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Sastav masnih kiselina (iskazan u % od ukupnih masnih kiselina) sortnih djevičanskih maslinovih ulja (prilagođeno prema Koprivnjak i sur., 2012).

Masna kiselina	Istarska bjelica	Leccino	Rosulja
Palmitinska (C16:0)	12,1 ± 0,8*	13,5 ± 1,1	13,5 ± 1,1
Stearinska (C18:0)	3,1 ± 0,6	1,9 ± 0,3	2,4 ± 0,4
Arahinska (C20:0)	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Oleinska (C18:1)	76,1 ± 2,0	75,7 ± 1,5	70,7 ± 1,6
Palmitoleinska (C16:1)	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,7
Eikosenska (C20:1)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Linolna (C18:2)	6,2 ± 1,2	6,3 ± 1,0	10,4 ± 1,2
α-Linolenska (C18:3)	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1

\*Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija podataka o udjelu masnih kiselina u uljima dobivenim u dvije uzastopne godine berbe (2010. i 2011.); broj uzoraka: Istarska bjelica 98, Leccino 48, Rosulja 19.

Neosapunjivi spojevi su uglavnom sekundarni metaboliti ploda i stabla masline te imaju znatno manji udio u DMU, ali imaju veliku važnost kao prirodni antioksidansi, te daju okus, miris i boju DMU (Klepo i Benčić, 2014).

Nutritivnoj vrijednosti DMU doprinose i tokoferoli, lipofilni spojevi s vitaminskim i antioksidacijskim djelovanjem, a njihov udio kreće se od 100 do 300 mg/kg ulja i ovisi o sorti masline (Boskou i sur., 2006; Koprivnjak i sur., 2012; tablica 2). Najzastupljeniji tokoferol u DMU je α-tokoferol (oko 90%), koji ima izrazitu biološku aktivnost u odnosu na ostale tokoferole (β-, γ- i δ-tokoferol) koji su u manjoj mjeri zastupljeni u DMU (Boskou i sur., 2006). Alfa-tokoferol neutralizira djelovanje slobodnih radikala i sprječava lančane reakcije peroksidacije masnih kiselina na razini staničnih membrana (Mariotti i Peri, 2014).

**Tablica 2.** Maseni udio ukupnih tokoferola u sortnim djevičanskim maslinovim uljima (prilagođeno prema Koprivnjak i sur., 2012).

	Istarska bjelica	Leccino	Rosulja
<b>ukupni tokoferoli (mg/kg)*</b>	109,5 ± 33,0	315,0 ± 69,5	281,0 ± 63,5

\*Rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija podataka o ukupnim tokoferolima u uljima dobivenim u dvije uzastopne godine berbe (2010. i 2011.); broj uzoraka: Istarska bjelica 98, Leccino 48, Rosulja 19.

Hidrofilne fenolne tvari su snažni polarni antioksidansi u DMU. Njihovo antioksidacijsko djelovanje pospješuje prisutnost tokoferola posebice kada je udio fenola u ulju

relativno nizak. Svojim sinergističkim djelovanjem doprinose oksidacijskoj stabilnosti i trajnosti DMU (Boskou, 2009).

## 2.2. Fenolne tvari u djevičanskom maslinovom ulju

Fenolne tvari velika su skupina sekundarnih biljnih metabolita koje u strukturi imaju aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. U posljednje vrijeme predmet su brojnih istraživanja jer uvelike utječu na senzorska svojstva i nutritivnu vrijednost DMU (Mariotti i Peri, 2014). Plod masline sadrži veliku količinu fenolnih spojeva koji su pretežno zastupljeni u pulpi ploda (1-3% svježe mase) i koji tijekom prerade ploda prelaze u ulje (Servili i sur., 2013). Fenoli DMU pružaju specifične okusne karakteristike, kao što su gorčina, trpkost i pikantnost, te doprinose zdravstvenoj vrijednosti DMU (Servili i sur., 2013; Šarolić i sur., 2014).

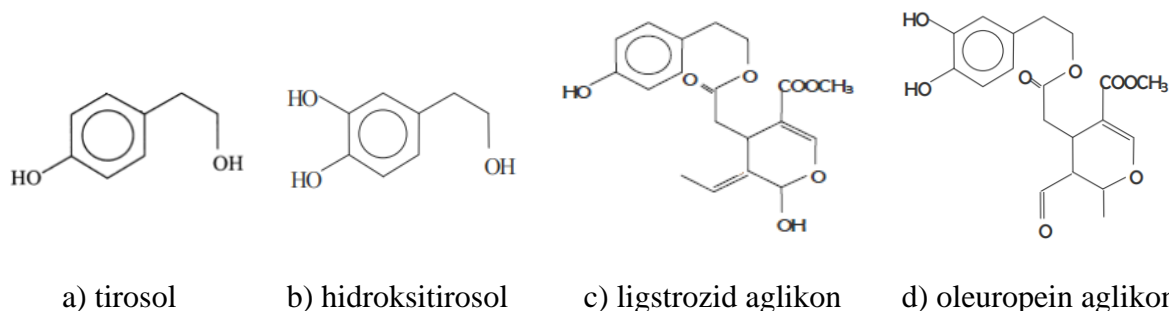
U DMU mogu se naći različite skupine fenolnih spojeva koji mogu biti u slobodnom te esterificiranom obliku. Do sada su opisane sljedeće glavne skupine fenolnih spojeva: jednostavni fenoli (fenolne kiseline i fenolni alkoholi), flavonoidi, lignani i sekoiridoidi (Servili i sur., 2013; Talhaoui, 2016).

**Fenolne kiseline** bile su prva skupina fenola otkrivena u DMU. Izdvajaju se kavaska, siringinska, vanilinska, *p*-hidroksibenzojeva, *p*-kumarinska, *o*-kumarinska i galna kiselina (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Glavni **fenolni alkoholi** zastupljeni u DMU su tirosol (*p*-hidroksifenil etanol) i hidroksitirosol (3,4-dihidroksifenil etanol) (slika 1). Oni su prisutni u manjim količinama u svježim uljima, a tijekom skladištenja DMU njihova koncentracija raste kao posljedica hidrolize sekoiridoida koji u svojoj kemijskoj strukturi sadrže tirosol ili hidroksitirosol. Hidroksitirosol ima snažno antioksidacijsko djelovanje zahvaljujući –OH skupinama u *orto* položaju na benzenskom prstenu (Servili i sur., 2013).

Najvažniji **flavonoidi** u DMU su luteolin i apigenin, dok su glavni **lignani** pinosresinol i acetoksinosresinol (Jimenez-Lopez i sur., 2020).

**Sekoiridoidi** su strukturno kompleksni fenolni spojevi, obilno prisutni u lišću i plodu masline. Sekoiridoidi iz plodova prelaze u ulje tijekom procesa ekstrakcije pri čemu djelovanjem enzima (polifenol oksidaze i  $\beta$ -glukozidaze) nastaju oblici ovih spojeva topljivi u ulju. Najčešći sekoiridoidi u DMU su aglikoni oleuropeina i ligstrozida (slika 1) te dialdehidini oblici dekarboksimetil elenolne kiseline povezane s hidroksitirosolom ili tirosolom. Gorčini

DMU najviše doprinose sekoiridoidi posebice dialdehidni oblik oleuropein aglikona (Servili i sur., 2013; Talhaoui, 2016; Jimenez-Lopez i sur., 2020).



**Slika 1.** Strukturne formule nekih fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju (Servili i sur., 2013).

Udio ukupnih fenolnih tvari u DMU kreće se od 50 do 1000 mg/kg, najčešće oko 500 mg/kg (Boskou, 2009), a ovisi o sorti (tablica 3), stupnju zrelosti ploda te primijenjenom postupku ekstrakcije ulja (Gorzynik-Debicka i sur., 2018; Jimenez-Lopez i sur., 2020). Fenolne tvari su topljive u vodi te se iz tog razloga dio fenolnih spojeva gubi tijekom prerade maslina u maslinovo ulje s biljnom vodom i kominom. Stoga, pretjerano dodavanje vode u maslinovo tijesto tijekom prerade maslina može rezultirati smanjenjem udjela fenola u DMU. U svim koracima prerade, fenolni spojevi iz ploda masline raspodjeljuju se između ulja, biljne vode i komine. Criado-Navarro i sur. (2022) pratili su raspodjelu fenolnih tvari između tih faza kod dviju španjolskih sorti maslina (Arbequina i Picual) tijekom industrijske prerade s horizontalnom centrifugom s dva izlaza. Utvrđene su razlike u raspodjeljivanju fenolnih tvari kod ovih sorti, te je kod sorte Arbequina osobito izražen prijelaz sekoiridoida u ulje (70%). Fenolne kiseline i alkoholi pretežno se gube kominom (40-60%) te biljnom vodom (25-50%), a manji dio prijeđe u ulje. Prijelaz flavonoida i triterpena u ulje je malen budući da 90% ovih fenola zaostane u komini.

**Tablica 3.** Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u sortnim djevičanskim maslinovim uljima (prilagođeno prema Koprivnjak i sur., 2012).

	Istarska bjelica	Leccino	Rosulja
maseni udio (mg kavske kis./kg ulja)*	653	353	388

\*Rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija podataka o ukupnim fenolima u uljima dobivenim u dvije uzastopne godine berbe (2010. i 2011.); broj uzoraka: Istarska bjelica 98, Leccino 48, Rosulja 19.

### 2.2.1. Biološka aktivnost i potencijalni zdravstveni učinci fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja

DMU je visoko zastupljeno u mediteranskoj prehrani koja se povezuje s niskom učestalosti kardiovaskularnih bolesti u južnom dijelu EU te duljim životnim vijekom u odnosu na sjeverne zemlje EU i SAD. Dosadašnja istraživanja ukazuju da fenolni spojevi u DMU imaju antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, kardioprotektivno i antitumorsko djelovanje (Jimenez-Lopez i sur., 2020). U tablici 4 prikazana su biološka svojstva i potencijalni zdravstveni učinci DMU.

**Tablica 4.** Biološka aktivnost i potencijalni zdravstveni učinci fenolnih tvari djevičanskog maslinovog ulja (Šarolić i sur., 2014).

BIOLOŠKA AKTIVNOST	STANJA I BOLESTI NA KOJE DJELUJE
Antioksidativno djelovanje	Kardiovaskularne i degenerativne bolesti
Protuupalno djelovanje	Inhibicija proinflamatornih enzima
Antimikrobno djelovanje	Zarazne bolesti
Anti-aterogeno djelovanje	Koronarne bolesti srca, moždani udar
Antitumorsko djelovanje	Karcinomi (dojke, prostate, debelog crijeva i maternice)
Anti-agregacija trombocita	Koronarne bolesti srca, moždani udar
Antihipertenzivno djelovanje	Hipertenzija
Povećana aktivnost vitamina A i $\beta$ -karotena	Starenje i zaštita kože
Povećana imunološka aktivnost	Zarazne bolesti, razne vrste karcinoma
Smanjenje razine kolesterola u plazmi i oksidiranog LDL-a	Koronarne bolesti srca

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) odobrila je korištenje zdravstvene tvrdnje u označavanju DMU o zaštitnom učinku hidroksitirosola i njegovih derivata na oksidaciju lipida u krvi kod konzumacije najmanje 5 mg/dan tih fenolnih tvari u obroku od 20 g DMU (Uredba 432/2012).

Preventivna uloga polifenola u DMU protiv kardiovaskularnih bolesti (infarkt miokarda, srčana insuficijencija i arterijska hipertenzija) ispitana je u istraživanju koje je procjenjivalo učinak DMU s niskim i visokim udjelom fenola na markere rizika kardiovaskularnih bolesti (KVB). Maslinovo ulje s visokim udjelom fenola značajno je smanjilo markere rizika KVB (malondialdehid, oksidirani lipoprotein niske gustoće, ukupni

kolesterol, lipoprotein visoke gustoće i kolesterol) i neke upalne pokazatelje poput C-reaktivnog proteina (George, 2019).

### 2.3. Metode određivanja fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom ulju

Metoda po Folinu i Ciocalteu uobičajena je i široko korištena za određivanje ukupnih fenola u uzorcima hrane i pića, budući da je brza, jednostavna i jeftina. Razvijena je 1927. godine za određivanje aromatskih aminokiselina tirozina i triptofana u bjelančevinama (Folin i Ciocalteu, 1927), a kasnije su je modificirali Singleton i Rossi (1965). Ova kolorimetrijska metoda neizravno mjeri ukupne fenole na temelju reducirajućih svojstava spojeva iz hrane ili pića. Oksidacijom fenola u alkalnom mediju dolazi do prijenosa elektrona na kompleks fosfolvolframove i fosfomolibdene kiseline koje se nalaze u Folin-Ciocalteu reagensu uslijed čega nastaju plavo obojeni produkti. Intenzitet plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 725 do 750 nm. Glavni nedostaci ove metode su niska točnost i specifičnost zbog brojnih interferencija s drugim tvarima koje nisu fenoli, posebice s bjelančevinama, aminokiselinama, askorbinskom kiselinom, šećerima, aromatskim aminima, organskim kiselinama,  $Fe^{2+}$  i sumporovim dioksidom. Oko 50 spojeva prirodno sadržanih ili dodanih kao aditivi u voću, povrću ili drugim prehrambenim proizvodima mogu interferirati s Folin-Ciocalteu reagensom (Medina, 2011b; Pico i sur., 2020; Lester i sur., 2012).

Predlagane su različite tehnike za poboljšanje specifičnosti Folin-Ciocalteu metode, uglavnom temeljene na fizičkom uklanjanju interferirajućih tvari. Jedna od najčešće korištenih tehnika pročišćavanja fenolnih ekstrakta je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, *eng. solid phase extration*). Procedura pročišćavanja može biti dugotrajna i može dovesti do razgradnje fenolnih spojeva tijekom pripreme uzoraka. Osim toga, kod izračuna ukupnog sadržaja fenola može se oduzeti sadržaj askorbinske kiseline kao interferirajuće tvari (Pico i sur., 2020).

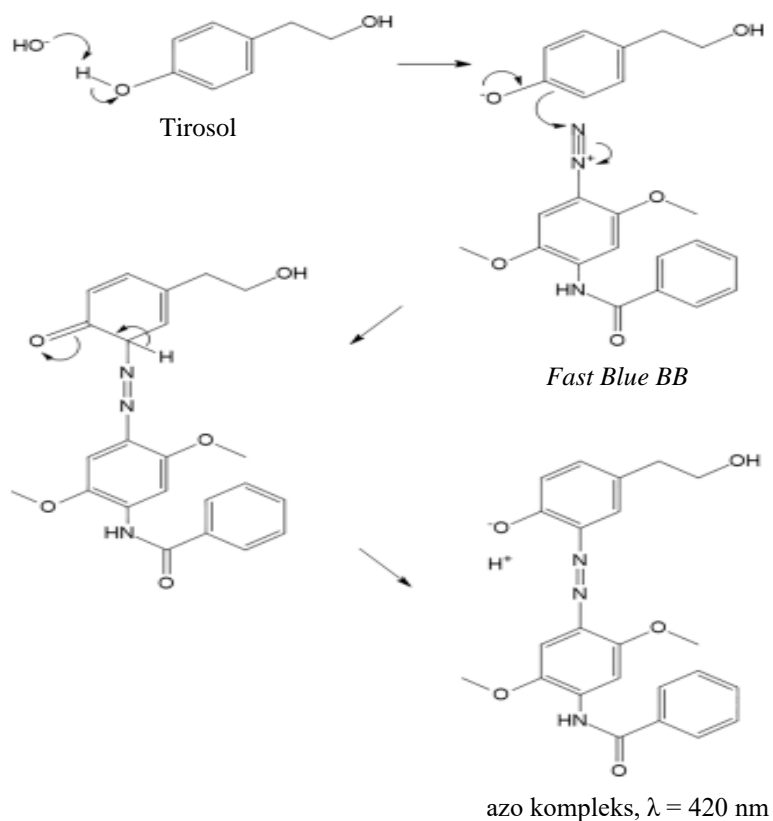
Za određivanje i kvantifikaciju fenolnih spojeva u DMU predložene su brojne analitičke metode koje se temelje na spektrofotometrijskim, enzimskim i kromatografskim tehnikama. Sve imaju određena analitička ili praktična ograničenja te nisu prihvaćena za rutinsku primjenu (Siano i sur., 2022). Za određivanje sastava fenola i njihovu kvantifikaciju u DMU, Međunarodno vijeće za masline (IOC) je predložilo tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti s UV detektorom (HPLC-UV). Kromatografski se analiziraju vodeno-alkoholni ekstrakti DMU (metanol/voda 80/20 (V/V)), a siringinska kiselina se koristi kao interni standard (IOC, 2017). Ova metoda je osjetljiva i specifična, ali zahtijeva relativno skupe



instrumente i dugotrajna je (jedno kromatografsko razdvajanje traje oko jedan sat). Iz tih razloga čak ni HPLC-UV metoda ne primjenjuje se za brzo rutinsko određivanje fenolnih spojeva u DMU (Siano i sur., 2022; Cicerale i sur., 2008; Visioli i sur., 2002).

## 2.4. Karakteristike *Fast Blue BB* testa

*Fast Blue BB* test je spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih fenola koju je razvila i primijenila Medina (2011a, 2011b) na voćne sokove, žitarice, svježe i suho voće. Test se temelji na reakciji *Fast Blue BB* diazonijeve soli, koja sadrži elektrofilnu diazonijevu skupinu ( $-N\equiv N$ ), s  $-OH$  skupinama na aromatskom prstenu (tj. fenolima) u alkalnim uvjetima. Spajanjem ovih dviju komponenti nastaju stabilni žuto obojeni azo kompleksi koji se potom mjere s UV-VIS spektrofotometrom na valnoj duljini od 420 nm (slika 2) (Siano i sur., 2022).



**Slika 2.** Reakcija *Fast Blue BB* diazonijeve soli s tirosolom u lužnatim uvjetima (Siano i sur., 2022).

Do sada je *Fast Blue BB* test korišten za određivanje ukupnih fenola u prehrambenim proizvodima poput voća, sokova i žitarica (Lesteri sur., 2012; Medina, 2011b), a nedavno i u mahunarkama, orašastim plodovima i sjemenkama (Pico i sur., 2020). Također, Lamothe i sur. (2016) ispitali su antioksidativnu aktivnost i otpuštanje hranjivih tvari iz sira obogaćenog

polifenolima u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima koristeći *Fast Blue BB* test, a Acosta i Almirall (2021) su pokazali da se *Fast Blue BB* test može koristiti za razlikovanje kanabisa tipa konoplje i marihuane. Siano i sur. (2022) proveli su određivanje ukupnih fenola izravno na DMU izostavljajući korak ekstrakcije fenolnih tvari, te su utvrdili da rezultati *Fast Blue BB* testa i rezultati HPLC analize pokazuju jaku korelaciju ( $R^2 = 0,9653$ ), za razliku od *Fast Blue BB* i Folin-Ciocalteu testa, koji su pokazali slabu korelaciju.

Preskakanje koraka ekstrakcije fenola polarnim otapalom sprječava moguću degradaciju fenolnih spojeva, a ujedno skraćuje vrijeme analize. Također, interferencija s drugim spojevima DMU, poput askorbinske kiseline, reducirajućih šećera i  $\alpha$ -tokoferola, nije moguća s diazonijevom skupinom. Izuzetak su  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol, s kojima bi *Fast Blue BB* mogao reagirati, no njihova koncentracija u DMU je vrlo mala (Siano i sur., 2022; Pico i sur., 2020).

*Fast Blue BB* test je brz, jeftin, jednostavan za izvođenje, siguran, robustan i može se lako izvoditi u više ponavljanja. Prednost *Fast Blue BB* testa je njegova selektivnost i visoka specifičnost za fenolne spojeve. Budući da ne zahtjeva posebne laboratorijske vještine, analiza bi se mogla rutinski izvoditi, kao brzi test u uljarama, za procjenu sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u DMU. Tada bi se boja dobivenih otopina mogla uspoređivati s tiskanom kolorimetrijskom ljestvicom, izostavljajući potrebu za spektrofotometrijskim mjerenjem (Siano i sur., 2022).

## **2.5. Filtracija djevičanskog maslinovog ulja i utjecaj na fenolne tvari**

Nakon ekstrakcije DMU je mutno zbog prisutnosti suspendiranih čestica biljnog tkiva i biljne vode emulgirane u ulju. To može negativno utjecati na kvalitetu DMU, pospješujući hidrolizu ili oksidaciju lipida, posebice kod ulja izloženih višim temperaturama tijekom čuvanja (Brkić Bubola i sur., 2017). Visok udio vode i suspendiranih čestica, tijekom skladištenja DMU, dovodi do razvitka negativnih senzorskih karakteristika, osobito defekta po uljnom talogu, i smanjenja nutritivne vrijednosti DMU (Bakhouche i sur., 2013; Brkić Bubola i sur., 2017). Stoga, da bi se izbjegla degradacija i produljio rok trajanja, filtracija je važan korak prije punjenja u ambalažu, u kojemu se uklanjaju suspendirane krute tvari i voda iz DMU (Bakhouche i sur., 2013).

Za filtraciju DMU primjenjuju se različite tehnike koje uključuju tradicionalne sustave kao što su naplavni filtarski spremnici, filtarske preše te alternativni sustavi s vrećama za

filtraciju ili s protokom inertnog plina (slika 3) (Lozano-Sánchez i sur., 2010). Filtracija se može provesti uz uporabu dijatomejske zemlje, filtara od celuloznih vlakana (slika 3) i drugih materijala. Tijekom filtracije DMU, ovisno o primijenjenom sustavu i filtracijskom sredstvu, može doći do kvantitativnih i kvalitativnih promjena pojedinih sastojaka DMU, kao što su voskovi, pigmenti, tokoferoli, hidrofilni fenoli i hlapljive tvari (Brkić Bubola i sur., 2017; Lozano-Sánchez i sur., 2010).



**Slika 3.** Različiti sustavi i sredstva za filtraciju (dostupno na: <https://www.agrovin.com> (a, b), <https://dutchfiltration.com> (c), <https://www.foodengineeringmag.com> (d), <https://theolivecentre.com> (e)).

Fenolne tvari su hidrofilne te uklanjanje vode filtracijom DMU može dovesti do smanjenja udjela fenola (osobito fenolnih alkohola) što za posljedicu ima smanjenje oksidacijske stabilnosti (Bakhouché i sur., 2013; Elsorady i sur., 2017; Gómez-Caravaca i sur., 2007). Brkić Bubola i sur. (2017) pratili su udio ukupnih fenola nakon filtracije filtarskom

prešom s celuloznim filtrima, u DMU domaćih sorti Buža i Istarska bjelica. Maseni udio fenola u DMU sorte Buža ostao je gotovo nepromijenjen nakon filtracije, dok se kod sorte Istarska bjelica smanjio za 60%. Smanjenje udjela ukupnih fenola nakon filtracije uočili su i Ghanbari Shendi i sur. (2019) kod DMU turske sorte Beylik. U istraživanju Bakhouche i sur. (2013) utvrdili su različit utjecaj filtracije na pojedine skupine fenolnih tvari. Korišten je naplavni filter, a sredstva za filtraciju bila su celuloza u prahu (100%) te mješavina celuloze (70%) i lignina (30%). Utvrđeno je da se filtracijom udio fenolnih alkohola i flavonoida smanjio, a sekoiridoida povećao.

### 3. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog diplomskog rada su:

- istražiti različite kombinacije tehnika i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* metode za određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinovom ulju, izravno na ulju tj. bez prethodne ekstrakcije fenolnih tvari,
- ispitati stabilnost otopine *Fast Blue BB* reagensa u etanolu (0,1% m/V) tijekom 30 dana čuvanja u hladnjaku (4 °C) i zamrzivaču (-20 °C),
- najpovoljniju kombinaciju tehnike i trajanja emulgiranja primijeniti kod prirodno dekantiranih i industrijski filtriranih sortnih djevičanskih maslinovih ulja,
- odrediti postoje li razlike u udjelu vode u sortnim prirodno dekantiranim i industrijski filtriranim djevičanskim maslinovim uljima.

## 4. MATERIJALI I POSTUPCI

### 4.1. MATERIJALI

#### 4.1.1. Uzorci djevičanskog maslinovog ulja

Za istraživanje kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* testa korišteno je ekstra djevičansko maslinovo ulje sorte Leccino (0,5 L, LOT: L01127, proizvođač: Meneghetti d.o.o., Stancija Menegetti 1, Bale, Hrvatska).

Najprikladnija kombinacija tehnike i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* testa primijenjena je na šest uzoraka sortnih ekstra djevičanskih maslinovih ulja proizvođača Meneghetti d.o.o. (Stancija Menegetti 1, Bale, Hrvatska). Korištena su tri nefiltrirana ulja, izbistrena prirodnim dekantiranjem, sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja (1 L, LOT: L112021) te tri industrijski filtrirana ulja istih sorti iz iste godine berbe (0,5 L, LOT: L01136).

#### 4.1.2. Kemikalije i reagensi

U radu su korištene sljedeće kemikalije i reagensi:

- Natrijev hidroksid, zrnca 1-2,5 mm, p. a., T.T.T., Hrvatska
- *Fast Blue BB* reagens [4-benzoilamino-2,5-dietoksibenzendiazonijev klorid hemi (cink klorid)] sol, Sigma-Aldrich, SAD, udio boje  $\geq 80\%$
- kavaska kiselina, čistoće 99%, Panreac, Španjolska
- etanol 96% V/V (UV-IR-HPLC), Panreac, Španjolska.

#### 4.1.3. Uređaji i pribor

U ovom radu korišteni su sljedeći uređaji:

- spektrofotometar HACH DR/400, Colorado, SAD
- centrifuga HETTICH EBA 200, Njemačka
- Vortex, IKA, GENIUS 3, Njemačka
- analizator vlage, HE73 Mettler Toledo, Švicarska
- ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex Digitec, Njemačka (140/560 W, 35 kHz)
- rotacijski vakuumski uparivač RV 10 digital, IKA, Njemačka
- semimikro analitička vaga Mettler Toledo, Švicarska

- magnetska miješalica, IKA big squid, Njemačka
- tresilica, IKA KS 130 basic, Njemačka.

Korišten je i sljedeći pribor:

- automatske pipete, Eppendorf Research, Njemačka
- plastične epruvete od 15 mL s čepom na navoj, šprice s iglama od 2 mL
- Pastuer pipete, staklene čaše od 50 mL, stakleni štapići, odmjerne tikvice (25, 50 i 200 mL), kruškolike tikvice od 25 mL, stakleni lijevci, staklene menzure, kivete za spektrofotometrijsko mjerenje od optičkog stakla, staklene teglice od 50 mL s čepovima na navoj, satno staklo
- staničevina, aluminijska folija.

## 4.2. POSTUPCI

### 4.2.1. Priprema *Fast Blue BB* otopine za određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinom ulju

Svakodnevno je pripremana svježa otopina *Fast Blue BB* reagensa u etanolu (0,1% m/V). U maloj staklenoj čaši odvagano je 0,05 g *Fast Blue BB* soli, te je u staklenu čašu menzutom dodano 35 mL etanola. Staklena čaša pokrivena je satnim stakalcem i stavljena na magnetsku miješalicu (800 o/min) te je pokrivena kartonskom kutijom da bi se otopina zaštitila od svjetlosti. Nakon otprilike 30 minuta, otopina je kvantitativno prelijeta u odmjernu tikvicu od 50 mL pomoću staklenog lijevka i štapića te dopunjena etanolom do oznake. Otopina je prelijeta u staklenu teglicu od 50 mL s čepom na navoj i obložena aluminijskom folijom.

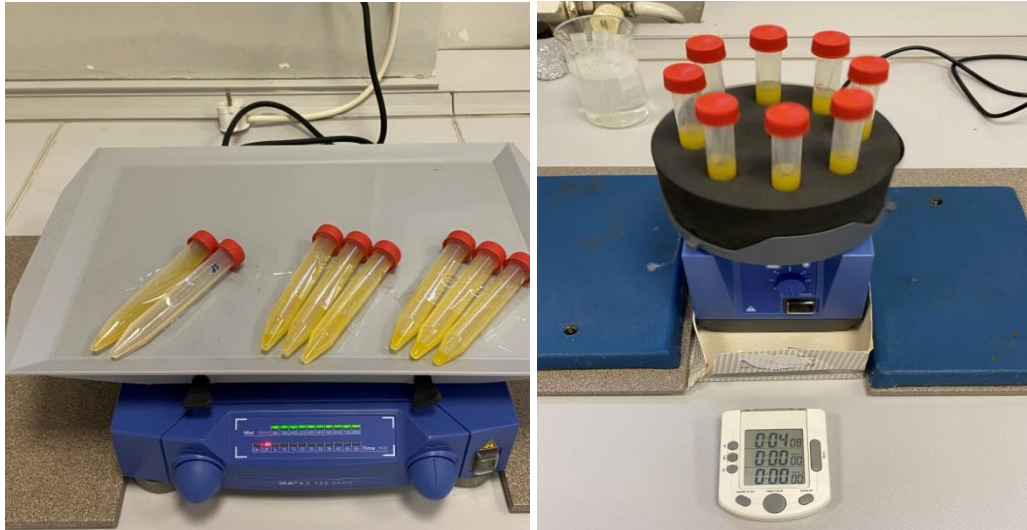
### 4.2.2. Uvjeti provođenja i određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinom ulju *Fast Blue BB* testom

U ovom radu korištena je metoda određivanja ukupnih fenola koju su opisali Siano i sur. (2022). *Fast Blue BB* test proveden je izravno na uzorcima DMU. U plastičnu epruvetu od 15 mL s čepom odvagano je od 1,0 do 1,3 g DMU. Dodano je 2,0 mL svježe pripremljene *Fast Blue BB* otopine u etanolu (0,1% m/V) i 2,0 mL 5%-tne otopine natrijevog hidroksida (m/V). Svaka epruveta je začepljena te je primijenjena jedna od kombinacija tehnike i trajanja emulgiranja (slika 4) iz tablice 5.

**Tablica 5.** Istraživane kombinacije tehnika i trajanja emulgiranja kod *Fast Blue BB* testa.

Metoda miješanja	Vrijeme inkubacije (min)
Vorteksiranje svake epruvete 2 min i miješanje na <b>horizontalnoj tresilici</b>	10, 20, 30
Vorteksiranje epruveta na spužvastom nastavku 2 min i inkubacija u <b>ultrazvučnoj kupelji</b>	10, 20, 30
<b>Vorteksiranje</b> epruveta na spužvastom nastavku uređaja	10, 20, 30





a)

b)

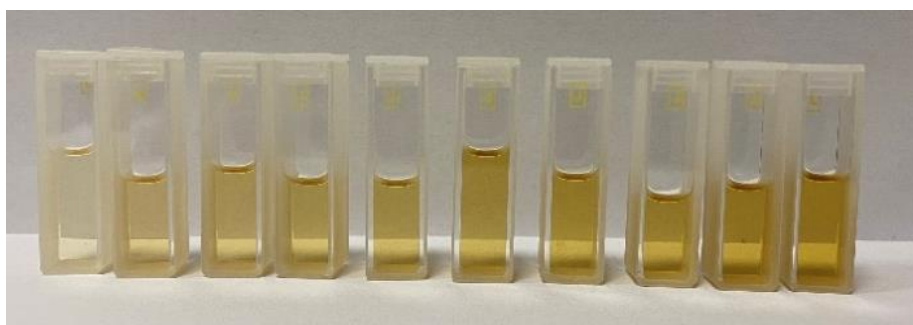
**Slika 4.** Istraživani reakcijski uvjeti *Fast Blue BB* testa, a) miješanje na horizontalnoj tresilici, b) vorteksiranje na spužvastom nastavku uređaja (Fotografije: M. Marković).

Postupak određivanja je proveden u sedam ponavljanja, te je istovremeno, u istim uvjetima, inkubirana slijepa proba (otopina *Fast Blue BB* reagensa i NaOH, bez ulja). Nakon inkubacije, epruvete su centrifugirane na 6000 o/min kroz 5 min, s ciljem izdvajanja vodeno-alkoholnog sloja. Da bi se dobio što bistriji vodeno-alkoholni ekstrakt, nakon centrifugiranja, automatskom pipetom izvučeno je 3 mL donjeg vodeno-alkoholnog sloja. Prenesen je u novu epruvetu od 15 mL s čepom na navoj i ponovo centrifugiran na 6000 o/min kroz 5min. Po završetku centrifugiranja, špricom od 2 mL s iglom izvučen je izbistreni vodeno-alkoholni sloj te je prenesen u kivetu za spektrofotometrijsko mjerenje od optičkog stakla. Izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 420 nm, uz slijepu probu. Maseni udio ukupnih fenola u DMU određen je pomoću jednadžbe baždarnog pravca, a izražen je u mg kavske kiseline po kg ulja.

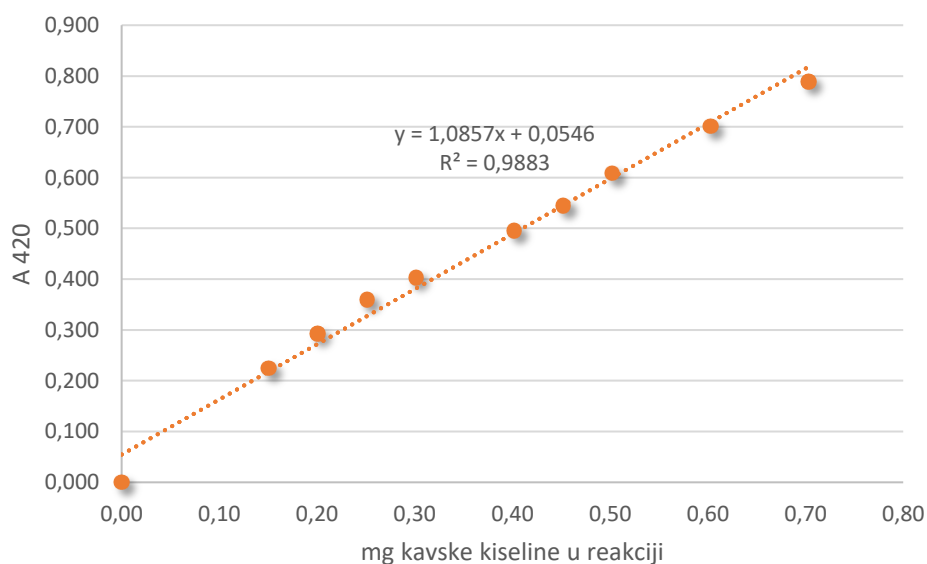
#### **4.2.3. Kvantifikacija fenolnih tvari u djevičanskom maslinovom ulju primjenom vanjskog standarda**

Za kalibraciju i kvantifikaciju korišten je vanjski standard i to kavaska kiselina. Pripremljena je otopina kavske kiseline u etanolu koncentracije 1 mg/mL. U devet kruškolikih tikvica od 25 mL preneseno je 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 600 i 700  $\mu$ L otopine kavske kiseline. Etanol iz otopine kavske kiseline uparen je na rotacijskom vakuumskom uparivaču uz temperaturu kupelji 30 °C. U kruškolike tikvice sa suhim ostatkom kavske kiseline dodano je 2,0 mL *Fast Blue BB* reagensa (0,1% m/V u etanolu) i 2,0 mL otopine NaOH (5% m/V). Sadržaj

svake kruškolike tikvice emulgiran je na Vorteks uređaju dvije minute i na horizontalnoj tresilici na 480 o/min 20 minuta. Sadržaj je prenet u kivete od optičkog stakla (slika 5), te je izmjerena apsorbancija na 420 nm, uz slijepu probu (otopina *Fast Blue BB* reagensa i NaOH, bez kavske kiseline). Izmjerene apsorbancije nanese su na os y kalibracijskog dijagrama, a mase kavske kiseline u pojedinoj tikvici na os x (slika 6). Maseni udio fenolnih tvari u ulju izračunat je pomoću sljedeće jednadžbe:  $x$  (mg kavske kiseline) =  $(A_{420} - 0,0546)/1,0857$ . Dobivena vrijednost podijeljena je masom ulja uzetom u reakciju i pomnožena s 1000 radi iskazivanja vrijednosti po kg ulja.



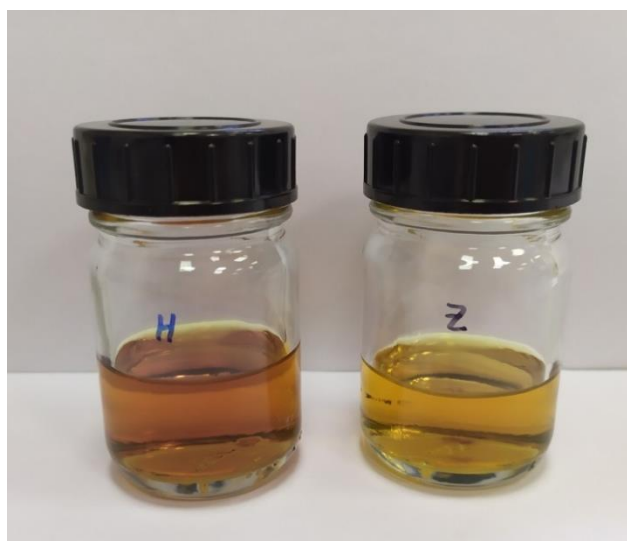
**Slika 5.** Reakcijske otopine *Fast Blue BB* reagensa s rastućim koncentracijama kavske kiseline za kalibraciju i kvantifikaciju (Fotografija: M. Marković).



**Slika 6.** Kalibracijski pravac za izračun ukupnih fenola.

#### 4.2.4. Ispitivanje stabilnosti otopine *Fast Blue BB* reagensa

U svrhu ispitivanja stabilnosti otopine *Fast Blue BB* pripremljene su dvije staklene teglice od 50 mL *Fast Blue BB* otopine kako je opisano u potpoglavlju 4.2.1. Jedna teglica pripremljene otopine *Fast Blue BB* čuvana je u hladnjaku na 4 °C, a druga u zamrzivaču na -20 °C. Teglice su izvađene iz hladnjaka i zamrzivača nakon 2, 3, 4, 10 i 30 dana čuvanja. Otopine su temperirane 1-2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se ispitala njihova stabilnost mjerenjem apsorbancija na 420 nm nakon reakcije s kavskom kiselinom (otopina u etanolu masene koncentracije 0,25 mg/mL). U plastičnu epruvetu od 15 mL dodano je 2,0 mL otopine kavske kiseline, 2,0 mL etanolne otopine *Fast Blue BB* i 2 mL otopine NaOH (5% m/V). Sadržaj epruvete emulgiran je na Vorteks uređaju sa spužvom 20 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 420 nm u odnosu na slijepu probu (pripremljena s etanolom umjesto s otopinom kavske kiseline). Izgled otopine *Fast Blue BB* reagensa nakon 30 dana čuvanja u hladnjaku i zamrzivaču prikazan je na slici 7.



**Slika 7.** Izgled otopina *Fast Blue BB* reagensa nakon 30 dana čuvanja u hladnjaku (H) i zamrzivaču (Z) (Fotografija: M. Marković).

#### 4.2.5. Određivanje udjela vode u ulju

Udio vode u nefiltriranim i filtriranim uljima navedenim u potpoglavlju 4.1.1. određen je pomoću analizatora vlage HE73, Mettler Toledo koji izravno izračunava udio vode u ulju (%).

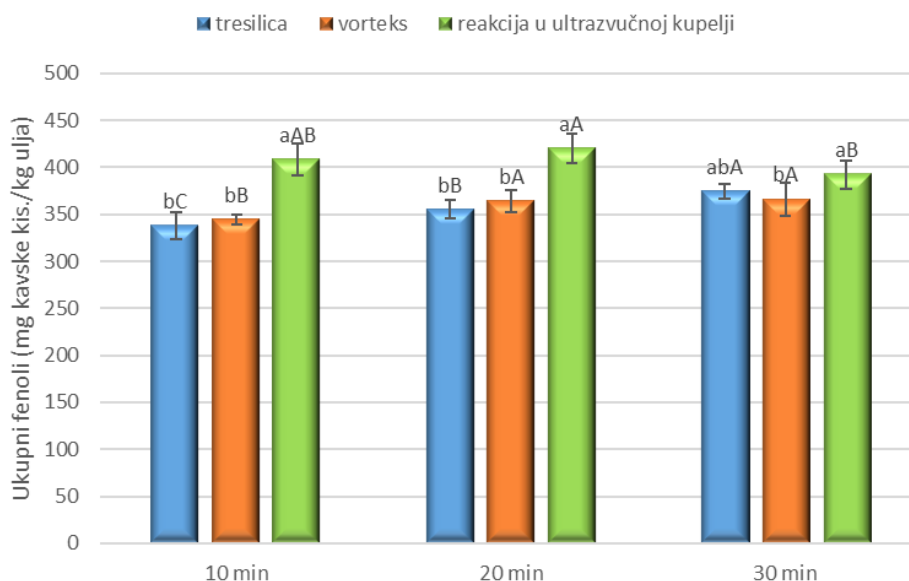
#### 4.2.6. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati ukupnih fenola i udjela vode u DMU međusobno su statistički uspoređivani primjenom računalnog programa *Statistica* 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija, SAD). Korišten je test jednosmjerne analize varijance (*one-way ANOVA*) na statističkoj razini značajnosti od 5% ( $p < 0,05$ ), pri čemu su rezultati uspoređeni *post-hoc* Tukeyevim testom značajnih razlika (*The Tukey's honest significant difference test – HSD*). Homogenost varijance ispitana je *Levenovim* testom. Za pripremu rezultata prije statističke obrade i izradu grafičkih prikaza korišten je *Microsoft Office Excel 2016*.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati ispitivanja različitih kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja kod *Fast Blue BB* testa za određivanje ukupnih fenola u djevičanskom maslinovom ulju

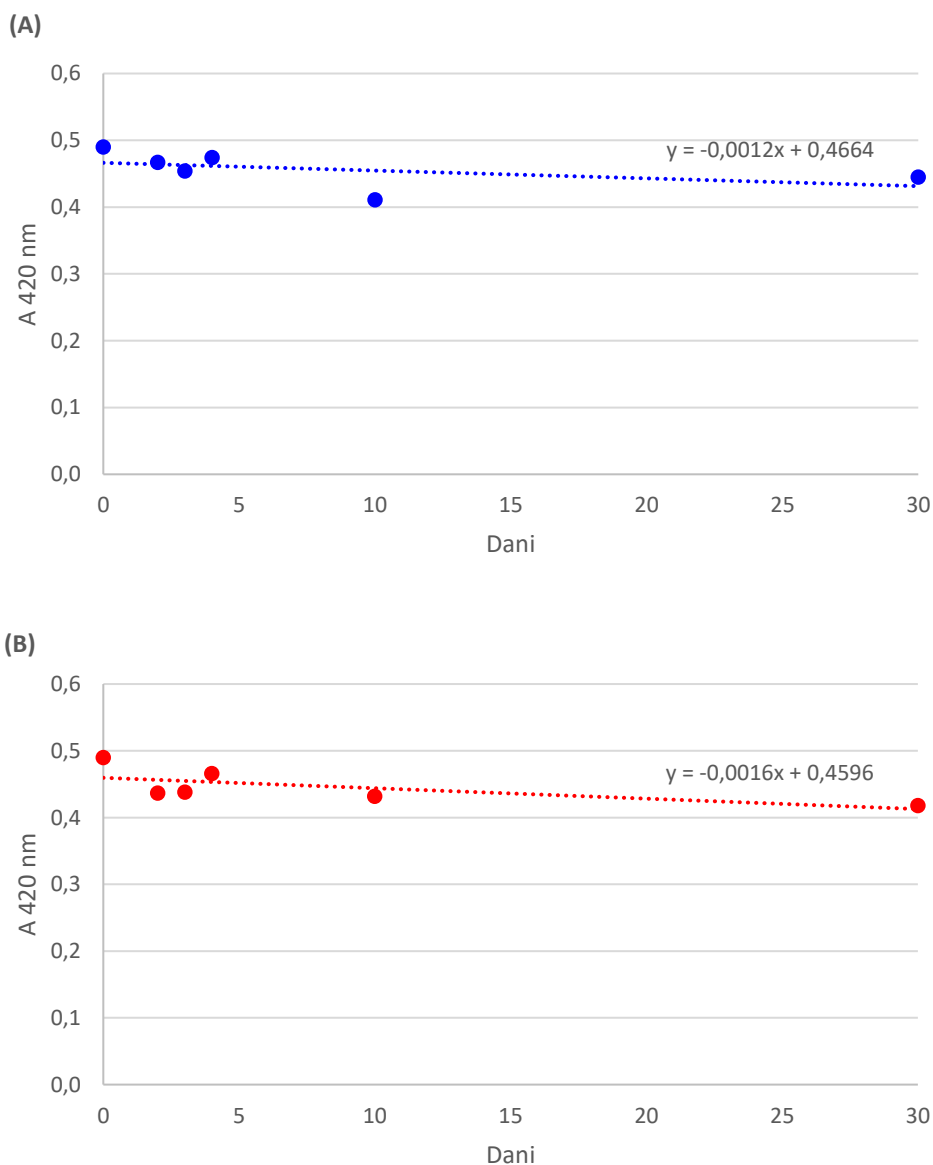
Slika 8 prikazuje utjecaj različitih kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja prilikom reakcije DMU s *Fast Blue BB* reagensom (miješanje na horizontalnoj tresilici, vorteksiranje na spužvastom nastavku, reakcija u ultrazvučnoj kupelji te vrijeme reakcije 10, 20 i 30 minuta) na maseni udio ukupnih fenola iskazanih u mg kavске kiseline/ kg ulja. Maseni udio ukupnih fenola u DMU kretao se od  $337,7 \pm 14,1$  mg/kg (miješanje na horizontalnoj tresilici, 10 minuta) do  $420,4 \pm 15,6$  mg/kg (reakcija u ultrazvučnoj kupelji, 20 minuta). Povećanjem vremena ekstrakcije maseni udio fenolnih tvari statistički se značajno povećavao samo kod miješanja na horizontalnoj tresilici. Reakcija u ultrazvučnoj kupelji u trajanju 30 minuta negativno je utjecala na udio fenola koji se statistički značajno smanjio u odnosu na reakciju u ultrazvučnoj kupelji u trajanju 20 minuta.



**Slika 8.** Maseni udio ukupnih fenola u DMU sorte Leccino ovisno o kombinaciji tehnike i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* testa. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti sedam određivanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrijednosti unutar pojedinog vremena reakcije (10, 20 i 30 minuta), označene različitim malim slovima (a, b) ukazuju na statistički značajne razlike između tri različite tehnike emulgiranja, dok one unutar pojedine tehnike (tresilica, vorteks, ultrazvučna kupelj), označene različitim velikim slovima (A-C), ukazuju na statistički značajne razlike između vremena reakcije (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ).

## 5.2. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopine *Fast Blue BB* reagensa

Slika 9 prikazuje izmjerene apsorbancije *Fast Blue BB* reagensa u etanolu (0,1% m/V) čuvanog 30 dana u hladnjaku i zamrzivaču nakon pripreme. Apsorbancije su mjerene nakon reakcije s kavskom kiselinom (0,25 mg/mL) na 420 nm. Nakon 30 dana vrijednosti apsorbancija smanjile su se za 9% kada je reagens čuvan u hladnjaku te za 15% kada je bio čuvan u zamrzivaču u odnosu na vrijednosti izmjerene nulti dan.

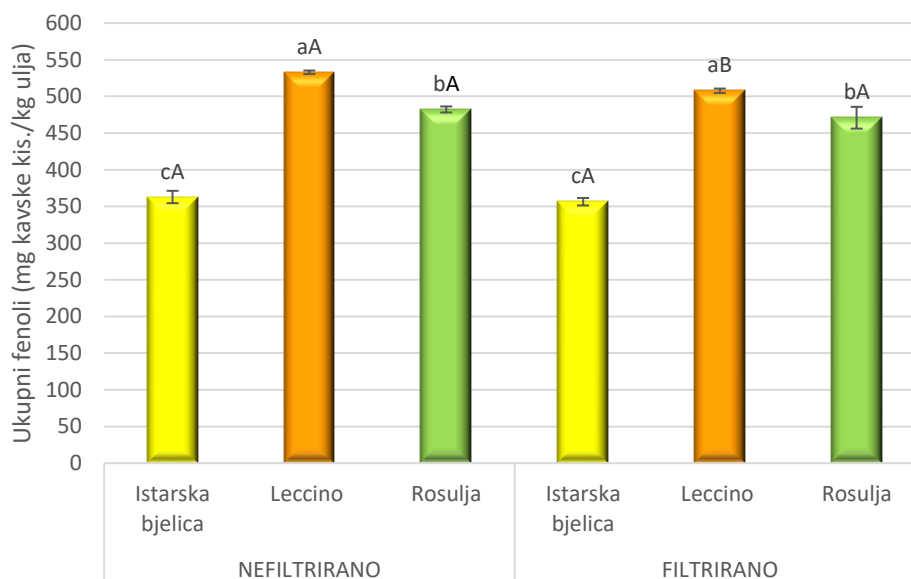


**Slika 9.** Vrijednosti apsorbancija na 420 nm nakon reakcije između kavske kiseline (0,25 mg/mL) i *Fast Blue BB* reagensa (0,1% m/V) čuvanog 30 dana u hladnjaku (A) i zamrzivaču (B).

### 5.3. Rezultati primjene odabrane kombinacije tehnike i trajanja emulgiranja kod *Fast Blue BB* testa na sortnim djevičanskim maslinovim uljima

Na slici 10 prikazani su maseni udjeli ukupnih fenola (mg kavske kiseline/kg ulja) određeni primjenom **vorteksiranja** na spužvastom nastavku u trajanju od **20 minuta** u nefiltriranom i filtriranom DMU sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja.

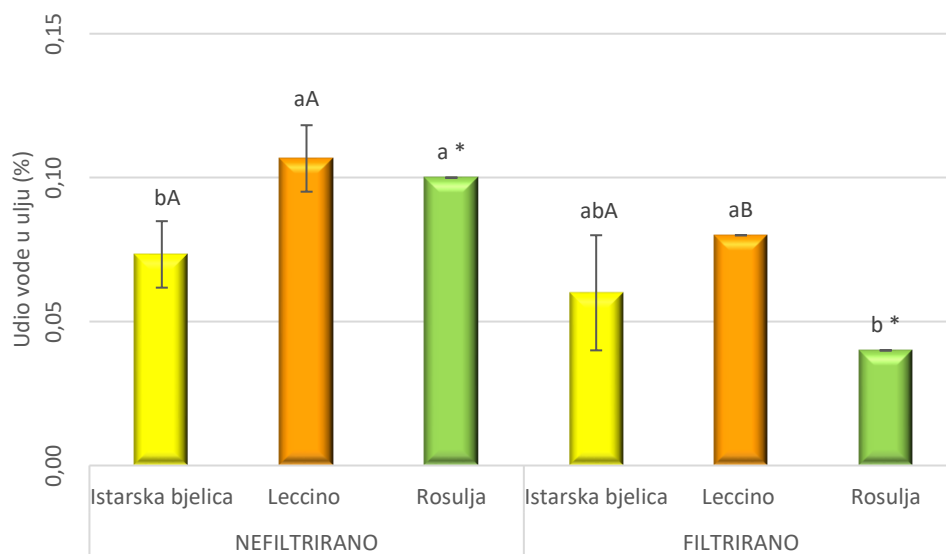
Prirodno dekantirano ulje sorte Leccino imalo je statistički značajno veći udio fenola ( $532,9 \pm 2,4$  mg/kg) od ulja sorti Rosulja ( $482,2 \pm 4,1$  mg/kg) i Istarska bjelica ( $362,9 \pm 8,4$  mg/kg). Udio ukupnih fenola u industrijski filtriranim uljima Istarske bjelice, Leccina i Rosulje bio je niži za 1,8%, 4,7% odnosno 2,3% u odnosu na prirodno dekantirana ulja, ali je to bilo statistički značajno samo kod ulja Leccina.



**Slika 10.** Maseni udjeli ukupnih fenola u nefiltriranom i filtriranom DMU sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja određenih *Fast Blue BB* testom, primjenom **vorteksiranja** na spužvastom nastavku **20 minuta**. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti triju određivanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrijednosti unutar nefiltriranih i filtriranih djevičanskih maslinovih ulja, označene različitim malim slovima (a-c) ukazuju na statistički značajne razlike između sortnih ulja, dok one unutar pojedinog sortnog ulja, označene različitim velikim slovima (A, B), ukazuju na statistički značajne razlike između nefiltriranog i filtriranog djevičanskog maslinovog ulja (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Udio vode u sortnim djevičanskim maslinovim uljima

Udjeli vode (%) u nefiltriranim i filtriranim DMU sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja, prikazani su na slici 11. Udio vode u nefiltriranim uljima kretao se od 0,07% (Istarska bjelica) do 0,11% (Leccino). Filtracija u industrijskim uvjetima rezultirala je statistički značajno nižim udjelom vode u ulju sorte Leccino (za 27% u odnosu na prirodno dekantirano ulje). Udio vode u industrijski filtriranim uljima Istarske bjelice i Rosulje također je bio niži, i to za 14% odnosno 60% u odnosu na prirodno dekantirana ulja.



**Slika 11.** Udjeli vode u nefiltriranim i filtriranim DMU sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja. Rezultati su iskazani u postocima i predstavljaju srednje vrijednosti triju mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrijednosti unutar nefiltriranih i filtriranih DMU, označene različitim malim slovima (a, b) ukazuju na statistički značajne razlike između sortnih ulja, dok one unutar pojedinog sortnog ulja, označene različitim velikim slovima (A, B), ukazuju na statistički značajne razlike između nefiltriranog i filtriranog DMU (Tukeyev test,  $p < 0,05$ ). \* – srednji kvadrat greške iznosi 0 te nije moguće utvrditi statistički značajnu razliku.



## 6. RASPRAVA

U ovom radu istražene su različite kombinacije tehnika i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* testa za određivanje ukupnih fenola izravno na ulju, bez prethodne ekstrakcije fenolnih tvari polarnim otapalima. Kombinirane su različite tehnike miješanja odnosno emulgiranja ulja s *Fast Blue BB* reagensom s različitim vremenom trajanja. U tu svrhu odabrano je DMU sorte Leccino, budući da je ta sorta široko rasprostranjena u svijetu. Iako je najviši udio fenola ostvaren reakcijom u ultrazvučnoj kupelji kroz 20 minuta, za nastavak istraživanja odabrano je vorteksiranje zbog praktičnosti i poteškoća s bistrenjem ekstrakta nakon reakcije u ultrazvučnoj kupelji. Vorteksiranje u trajanju 20 minuta primijenjeno je na uzorke monosortnih DMU koja su bila izbistrena prirodnim dekantiranjem te filtracijom na filtarskoj preši. Osim toga, u radu je istražena i stabilnost otopine *Fast Blue BB* reagensa tijekom 30 dana čuvanja u hladnjaku (4 °C) i zamrzivaču (-20 °C).

### 6.1. Utjecaj kombinacija tehnika i trajanja emulgiranja kod provođenja *Fast Blue BB* testa na ukupne fenole djevičanskog maslinovog ulja

U istraživanjima Medine (2011a i 2011b) *Fast Blue BB* test se provodio na ekstraktima dobivenim mješavinom metanola i vode (80/20, V/V) iz uzoraka sokova, voća, pića i žitarica. Također, Siano i sur. (2022) ekstrahirali su polarne spojeve iz DMU prema metodi Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2017) i odredili ih *Fast Blue BB* testom. Međutim, to je rezultiralo preniskim udjelima ukupnih fenola (30-146 mg/kg) u usporedbi s rezultatima dobivenim HPLC-UV metodom (213-790 mg/kg) na istim ekstraktima. Uočene razlike autori su pripisali ograničenoj raspodjeli fenolnih tvari u otopini prilikom nastanka azo kompleksa u reakciji s *Fast Blue BB* soli. Iz tog razloga, Siano i sur. (2022) su istražili primjenu *Fast Blue BB* testa izravno na DMU, bez prethodne ekstrakcije fenola 80%-tnim metanolom. U tom slučaju su utvrdili visoku korelaciju *Fast Blue BB* testa odnosno apsorbancija mjerenih na 420 nm i koncentracija fenolnih tvari određenih HPLC-UV metodom. Siano i sur. (2022) provodili su *Fast Blue BB* test izravno na DMU uz miješanje u trajanju od 20 minuta, međutim nisu opisali kako su proveli miješanje niti su naveli koji uređaj su koristili u tu svrhu.

U ovom radu, maseni udio ukupnih fenola u ulju Leccina određen *Fast Blue BB* testom, kretao se od prosječno 337,7 mg/kg ulja (kod miješanja na horizontalnoj tresilici, 10 minuta) do 420,4 mg/kg (kod reakcije u ultrazvučnoj kupelji, 20 minuta) (slika 8). Produljenje vremena ekstrakcije do 30 minuta, statistički je značajno povećalo maseni udio fenolnih tvari samo kod

miješanja na horizontalnoj tresilici (do 374,5 mg/kg). Taj učinak izostao je kod vorteksiranja i ultrazvučnog emulgiranja reakcijske otopine. Udio ukupnih fenola vorteksiranjem 30 minuta (prosjek 365,9 mg/kg) nije se statistički značajno promijenio u odnosu na vorteksiranje 20 minuta (prosjek 364,1 mg/kg). Reakcija u ultrazvučnoj kupelji u trajanju 30 minuta negativno je utjecala na udio fenola koji se statistički značajno smanjio u odnosu na reakciju u ultrazvučnoj kupelji u trajanju 20 minuta (za 7%).

Šindrak i sur. (2007) utvrdili su da udio ukupnih fenola u ulju sorte Leccino iznosi od 254,0 mg/kg (za vrijeme kišne godine) do 1284,5 mg/kg (za vrijeme sušne godine). U tom istraživanju udio ukupnih fenola određen je metodom s Folin-Ciocalteu reagensom s kojim, osim fenola, mogu reagirati i drugi spojevi s reducirajućim djelovanjem (Medina, 2011b; Pico i sur., 2020). *Fast Blue BB* test visoko je specifičan za fenolne tvari te s *Fast Blue BB* soli mogu eventualno reagirati  $\beta$ - i  $\gamma$ -tokoferol (Siano i sur., 2022; Pico i sur., 2020), a njihov udio u DMU u pravilu je nizak. Udio  $\beta$ -tokoferola u uljima sorte Leccino kreće se od 0 do 0,8 mg/kg, a udio  $\gamma$ -tokoferola od 3,9 do 10,5 mg/kg (Koprivnjak i sur., 2012). Dakle, radi se o vrlo malim udjelima koji mogu neznatno povisiti rezultat ukupnih fenola određenih *Fast Blue BB* testom.

Siano i sur. (2022) navode kako bi se reakcija fenola i *Fast Blue BB* reagensa mogla ubrzati ako se epruvete urone u ultrazvučnu kupelj. To se potvrdilo i ovim istraživanjem, te su vrijednosti ukupnih fenola primjenom ultrazvučne kupelji bile statistički značajno više u usporedbi s vorteksiranjem i miješanjem na horizontalnoj tresilici, nakon 10 i 20 minuta reakcije (slika 8). Međutim, primjenom ultrazvučne kupelji vodeno-alkoholni sloj, kojeg treba izdvojiti nakon reakcije, kod pojedinih uzoraka bilo je vrlo teško izbistriti centrifugiranjem (slika 12). U tom je slučaju centrifugiranje bilo potrebno provesti nekoliko puta do postizanja potpune bistroće nužne za spektrofotometrijsko mjerenje. Osim što to produljuje vrijeme provođenja analitičkog postupka, razlika u bistroći je mogući uzrok veće varijabilnosti rezultata tj. većih standardnih devijacija kod primjene ultrazvuka u usporedbi s druge dvije tehnike miješanja. Također, istražena je i mogućnost kraće primjene ultrazvuka, u trajanju od pet minuta. Dobiven je maseni udio ukupnih fenola  $353,0 \pm 25,1$  mg/kg ulja (srednja vrijednost sedam određivanja, podatak nije prikazan) što je slično rezultatu dobivenom 20 minutnim vorteksiranjem i miješanjem na tresilici. Iako se reakcija odvija brzo, zbog navedenih nedostataka, ultrazvuk nije korišten u daljnjem određivanju ukupnih fenola *Fast Blue BB* metodom. Radi praktičnosti i prihvatljive varijabilnosti rezultata za nastavak istraživanja odabrano je vorteksiranje na spužvastom nastavku u trajanju od 20 minuta.

## 6.2. Stabilnost otopine *Fast Blue BB* reagensa

Većina dosadašnjih istraživanja (Siano i sur., 2022; Medina, 2011a i 2011b; Lamothe i sur., 2014) navodi da otopina *Fast Blue BB* reagensa u etanolu treba biti svježja i pripremana svakodnevno. Da bi se ispitala mogućnost pripreme većeg volumena otopine *Fast Blue BB* reagensa i korištenja iste više uzastopnih dana, u plan istraživanja uključeno je ispitivanje stabilnosti otopine na temperaturama čuvanja 4 °C i -20 °C.

Tijekom 30 dana čuvanja otopine *Fast Blue BB* u hladnjaku i zamrzivaču, vrijednosti apsorbancija mjerenih nakon reakcije s kavskom kiselinom (koncentracije 0,25 mg/mL) su se smanjivale (slika 9). Vrijednosti apsorbancija smanjile su se za 3% te za 5% nakon pet dana čuvanja u hladnjaku odnosno zamrzivaču, dok su se vrijednosti nakon 30 dana čuvanja smanjile za 9% odnosno 15% (slika 9). Osim toga, otopina *Fast Blue BB* reagensa izgubila je na intenzitetu boje nakon 30 dana čuvanja u zamrzivaču (slika 7). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je pogodnije čuvati etanolnu otopinu *Fast Blue BB* reagensa u hladnjaku.

Stabilnost otopine *Fast Blue BB* reagensa nakon dužeg vremena čuvanja na sobnoj temperaturi (20 °C) i u hladnjaku na 0 °C ispitali su Acosta i Almirall (2021). Pratili su stabilnost i promjenu boje etanolne otopine nakon 7 i 45 dana. Utvrdili su da je otopina čuvana na sobnoj temperaturi izgubila žutu boju već nakon tjedan dana čuvanja, dok kod otopine čuvane na 0 °C nije došlo do značajnih promjena boje. Autori zaključuju da, unatoč tome što je otopina *Fast Blue BB* reagensa nestabilna na sobnoj temperaturi, ostaje prikladna za korištenje kod čuvanja na temperaturi hladnjaka najmanje 45 dana nakon pripreme. Ovim dijelom istraživanja potvrđeno je da je *Fast Blue BB* reagens stabilan te se može koristiti unutar pet dana nakon pripreme uz čuvanje u hladnjaku.

## 6.3. Utjecaj filtracije sortnih djevičanskih maslinovih ulja na ukupne fenole

Udio ukupnih fenola nefiltriranih, tj. prirodno dekantiranih sortnih ulja, statistički se značajno razlikovao (slika 10). Ulje Leccina imalo je neuobičajeno visok udio fenola (532,9 mg/kg ulja), a ulje Istarske bjelice imalo je najniži udio ukupnih fenolnih tvari (362,9 mg/kg ulja), što nije očekivano s obzirom na to da su ulja Istarske bjelice poznata po visokom udjelu ukupnih fenola (Koprivnjak i sur., 2012).

Poznato je da nakon filtracije DMU, ovisno o primijenjenom sustavu i filtracijskom sredstvu, dolazi do smanjenja udjela ukupnih fenola (Bakhouche i sur., 2013; Brkić Bubola i

sur., 2017; Lozano-Sánchez i sur., 2010). Fenolne tvari su hidrofilnog karaktera te se gube s vodom koja se uklanja iz ulja tijekom filtracije DMU (osobito fenolni alkoholi) (Bakhouché i sur., 2013; Gómez-Caravaca i sur., 2007). Također, mnogi autori koji su koristili različita filtarska sredstva i sustave filtracije DMU, navode i zadržavanje fenolnih spojeva na filtarskim sredstvima kao mogući razlog gubitka fenola (Bakhouché i sur., 2013; Lozano-Sánchez i sur., 2010, Gómez-Caravaca i sur., 2007). Udio ukupnih fenola filtracijom se statistički značajno smanjio u odnosu na prirodno dekantiranje samo kod ulja sorte Leccino (za 4,7% od udjela u nefiltriranom ulju). U uljima Istarske bjelice i Rosulje nakon filtracije udio ukupnih fenola smanjio se za 1,8% odnosno 2,3% u odnosu na nefiltrirana ulja (slika 10).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da filtracija nema jednak učinak tj. ne smanjuje udio ukupnih fenola kod svih sortnih DMU u jednakoj mjeri. To može biti posljedica različitog omjera i karakteristika tkiva ploda prisutnih u ulju te količine i veličine kapljica biljne vode kod različitih sortnih ulja. Brkić Bubola i sur. (2017) navode mogućnost da čestice biljnog materijala u ulju doprinose gubitku fenolnih tvari filtracijom. To je moguće kod ulja dobivenih preradom zelenih ili nedozrelih maslina, kod kojih su čestice biljnog tkiva čvršće i mogu stvoriti sloj na filteru koji zadržava dio fenolnih tvari. Smanjenje udjela fenola u ulju Istarske bjelice nakon filtracije puno je manje (samo za 1,8%) nego što su za istu sortu dobili Brkić Bubola i sur. (2017). U njihovom istraživanju udio ukupnih fenola smanjio se za 60% kod ulja Istarske bjelice nakon filtracije, a plodovi Istarske bjelice su u trenutku prerade imali nizak stupanj zrelosti (zeleni plodovi) te je ulje podvrgnuto filtraciji na filtarskoj preši s celuloznim filtrima odmah nakon prerade plodova u uljari. Ulja korištena u ovom istraživanju filtrirana su neposredno prije punjenja u boce te su prethodno skladištena otprilike 30 dana. Pored toga, ulja su do trenutka provođenja analiza čuvana na sobnoj temperaturi, pa se određeni dio fenola mogao potrošiti u oksidacijskim procesima tijekom skladištenja ulja (Elsorady i sur., 2017).

#### **6.4. Udio vode u sortnim djevičanskim maslinovim uljima**

Nefiltrirana odnosno prirodno dekantirana ulja Istarske bjelice, Leccina i Rosulje sadržavala su manji udio vode od maksimalno dopuštenih 0,2% prema standardu Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2019). Udio vode u nefiltriranim uljima kretao se od 0,07% (kod Istarske bjelice) do 0,11% (kod Leccina) (slika 11).

Udjeli vode svih industrijski filtriranih sortnih ulja bili su niži u usporedbi s udjelima prirodno dekantiranih ulja, a ta je razlika jedino kod ulja Leccina bila statistički značajna. Udio

vode u industrijski filtriranom ulju Rosulje bio je niži za čak 60%, no u tom slučaju nije bilo moguće izračunati statističku značajnost budući da je srednji kvadrat greške iznosio 0. Udio vode u industrijski filtriranom ulju Istarske bjelice bio je niži za samo 14% u usporedbi s prirodno dekantiranim uljem. Slično su potvrdila i druga istraživanja. Brkić Bubola i sur. (2017) utvrdili su da se filtracijom smanjuje sadržaj vode u DMU sorti Buža i Istarska bjelica, a Bakhouche i sur. (2014) da se udio vode filtracijom smanji za 20 do 36%.

## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, prikazanih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

- 1) Provođenjem *Fast Blue BB* testa emulgiranjem u ultrazvučnoj kupelji (20 minuta) dobivaju se najviše vrijednosti ukupnih fenola; postupak ipak nije izdvojen kao najprikladniji zbog otežanog bistrenja vodeno-alkoholnog sloja i veće varijabilnosti rezultata.
- 2) Od istraživanih tehnika emulgiranja, vorteksiranje ulja s *Fast Blue BB* reagensom u alkalnom pH, u trajanju od 20 minuta izdvojeno je kao najpraktičnija i najprikladnija tehnika za provođenje *Fast Blue BB* testa.
- 3) Etanolnu otopinu *Fast Blue BB* reagensa prikladnije je čuvati u hladnjaku, nego u zamrzivaču. Tijekom pet dana vrijednosti apsorbancija nakon reakcije s kavskom kiselinom smanjuju se za 3% kod čuvanja u hladnjaku te za 5% kod čuvanja u zamrzivaču.
- 4) Nefiltrirana sortna ulja međusobno se statistički značajno razlikuju po udjelu ukupnih fenola (Leccino 532,9 mg/kg, Rosulja 482,2 mg/kg, Istarska bjelica 362,9 mg/kg).
- 5) Sva industrijski filtrirana sortna ulja imaju niže udjele ukupnih fenola od prirodno dekantiranih (za 1,8% do 4,7%), no statistički značajna razlika postoji samo kod sorte Leccino.
- 6) Udio vode u nefiltriranim sortnim uljima niži je od maksimuma dopuštenog međunarodnim standardom te se kreće u rasponu od 0,07% (kod Istarske bjelice) do 0,11% (kod Leccina).
- 7) Sva industrijski filtrirana sortna ulja imaju niže udjele vode od prirodno dekantiranih (za 14% kod Istarske bjelice do 60% kod Rosulje), no statistički značajna razlika utvrđena je samo za sortu Leccino (udio vode niži za 27%).

*Fast Blue BB* test je brza, jeftina i visoko specifična metoda za određivanje ukupnih fenola u uljima. Primjena Vorteks uređaja sa spužvastim nastavkom u trajanju 20 minuta

najpraktičnija je i najprikladnija tehnika emulgiranja za laboratorijsko određivanje ukupnih fenolnih tvari ovom metodom.

## 8. LITERATURA

1. Acosta, A., Almirall, J. (2021). Differentiation between hemp-type and marijuana-type cannabis using the Fast Blue BB colorimetric test. *Forensic Chemistry*, 26, 100376.
2. Agrovin.com (2023). From the reception and cleaning of the olives to the finished product (mrežna stranica). Dostupno na: <<https://www.agrovin.com/en/machinery/olive-oil/>> (pristupljeno 19.6.2023.).
3. Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C.A., Martínez-García, M., Velasco, M.G., Govantes, Á.O., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2014). Monitoring the moisture reduction and status of bioactive compounds in extra-virgin olive oil over the industrial filtration process. *Food Control*, 40, 292–299.
4. Boskou D. (2009) Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. In: Boskou, D. (ed.): *Olive Oil Minor Constituents and Health*, 11-44. CRC Press, Boca Raton, SAD.
5. Boskou D., Blekas D., Tsimidou M. (2006) *Olive Oil, Chemistry and Technology*, AOCS Press, Champaign, SAD, 41-63.
6. Boskou, D. (2006) *Olive Oil, Chemistry and Technology, Second Edition*, AOCS Press, Champaign, Illinois.
7. Brkić Bubola, K., Lukić, M., Mofardin, I., Butumović, A., Koprivnjak, O. (2017). Filtered vs. naturally sedimented and decanted virgin olive oil during storage: Effect on quality and composition. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 370-377.
8. Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 218–236.
9. Criado-Navarro, I., Ledesma-Escobar, C.A., Parrado-Martínez, M.J., Marchal-López, R.M., Olmo-Peinado, J.M., Espejo-Calvo, J.A. I Priego-Capote, F. (2022). Monitoring the partition of bioactive compounds in the extraction of extra virgin olive oil, *LWT - Food Science and Technology*, 162, 113433.



10. DELEGIRANA UREDBA KOMISIJE (EU) 2022/2104 od 29. srpnja 2022. o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu tržišnih standarda za maslinovo ulje i o stavljanju izvan snage Uredbe Komisije (EEZ) br. 2568/91 i Provedbene uredbe Komisije (EU) br. 29/2012. Službeni list 284/1.
11. DutchFiltration.com (2018). Diatomaceous earth (mrežna stranica). Dostupno na: <https://dutchfiltration.com/products/filter-consumables/diatomaceous-earth/> (pristupljeno 19.6.2023.).
12. Elsorady, M. E. I., Girgis, A. Y., El-labban, A. A. (2017). Influence of filtration on olive oil quality during storage. *Life Science Journal*, 14(5), 17–26.
13. Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73, 627–650.
14. George, E. S., Marshall, S., Mayr, H. L., Trakman, G. L., Tatucu-Babet, O. A., Lassemillante, A.-C. M., Bramley, A., Reddy, A. J., Forsyth, A., Tierney, A. C., Thomas, C. J., Itsiopoulos, C., Mar, W. (2019). The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(17), 2772–2795.
15. Ghanbari Shendi, E., Sivri Ozay, D., Ozkaya, M. T., Ustunel, N. F. (2019). Effects of filtration and storage on chemical composition and sensory properties of olive oil extracted from Beylik cultivar. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(1), 31–41.
16. Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (2007). Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *American Journal of Food Technology*, 2, 671–678.
17. Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 686.

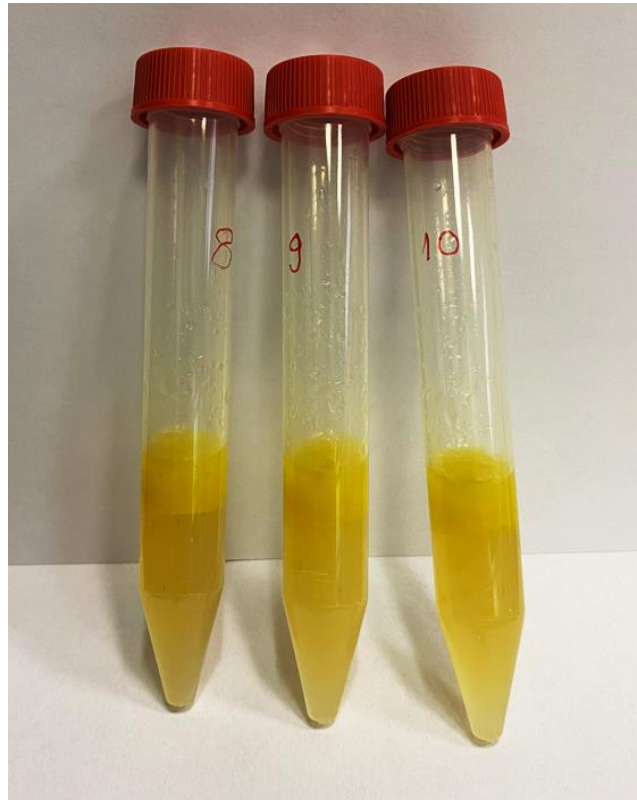
18. IOC – International Olive Council (2017). COI/T.20/Doc. No 29/Rev.1. Method of analysis. Determination of biophenols in olive oils by HPLC.
19. IOC – International Olive Council (2019). COI/T.15/NC No 3/Rev. 14. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils.
20. Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 9(8), 1014.
21. Klepo, T., Benčić, Đ. (2014). Utjecaj genotipa na kemijski sastav maslinovog ulja. *Glasnik Zaštite Bilja*, 37 (5), 44-53.
22. Koprivnjak, O., Vrhovnik, I., Hladnik, T., Prgomet, Ž., Hlevnjak, B. Majetić Germek, V. (2012). Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti Buža, Istarska bjelica, Leccino i Rosulja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 7 (3-4), 172-178.
23. Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., Britten, M. (2014). Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & function*, 5(10), 2621–2631.
24. Lamothe, S., Langlois, A., Bazinet, L., Couillard, C., Britten, M. (2016). Antioxidant activity and nutrient release from polyphenol-enriched cheese in a simulated gastrointestinal environment. *Food & Function*, 7(3), 1634–1644.
25. Lester, Gene E., Lewers, Kim S., Medina, Marjorie B., Saftner, Robert A. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 102–107.
26. Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics, *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 201–211.

27. Mariotti, M., Peri, C. (2014). The composition and nutritional properties of extra-virgin olive oil. U: *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook* (Peri, C., ured.), John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, NJ, USA; 21–34.
28. Medina, Marjorie B. (2011a). Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (5), 1565–1571.
29. Medina, Marjorie B. (2011b). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 79–87.
30. Pico, J., Pismag, R.Y., Laudouze, M., Martinez, M. M. (2020). Systematic evaluation of the Folin-Ciocalteu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant seeds. *Food & Function*, 11, 9868-9880.
31. Šarolić, M., Gugić, M., Marijanović, Z., Šuste, M. (2014). Virgin olive oil and nutrition. *Food in health and disease, scientific-professional journal of nutrition and dietetics*, 3 (1), 38-43.
32. Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Selvaggini, R., Taticchi, A. (2013). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 3 (1), 1–23.
33. Siano, F., Vasca, E., Picariello, G. (2022). Accurate determination of total biophenols in unfractionated extra-virgin olive oil with the fast blue BB assay. *Food Chemistry*, 370, 130990.
34. Šindrak, Z., Benčić, Đ., Voća, S., Barberić A. (2007). Ukupne fenolne tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima. *Pomologia Croatica*, 13 (1), 17-30.
35. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158
36. Spielman, S. (2021). Filtration for extra virgin olive oil ensures its purity (mrežna stranica). FoodEngineeringMag.com. Dostupno na:

<https://www.foodengineeringmag.com/articles/99894-filtration-for-extra-virgin-olive-oil-ensures-its-purity>> (pristupljeno 19.6.2023.).

37. Talhaoui, N. (2016). Analytical, agronomic, and biological evaluation of phenolic compounds in olea europaea products and by-products. Doctoral thesis, University of Granada.
38. TheOliveCentre.com (2023). Olive oil filtration (mrežna stranica). Dostupno na: <https://theolivecentre.com/shop/high-volume-olive-oil-filtration>> (pristupljeno 19.6.2023.).
39. UREDBA (EU) br. 1308/2013 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007. Službeni list L 347 20.12.2013, 671.
40. UREDBA KOMISIJE (EU) br. 432/2012 od 16. svibnja 2012. o utvrđivanju popisa dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece. Službeni list L 136/1.
41. Visioli, F., Poli, A., Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*, 22(1), 65–75.

## 9. PRILOZI



**Slika 12.** Izgled sadržaja epruveta (djevičansko maslinovo ulje i *Fast Blue BB* reagens u alkalnom pH) nakon emulgiranja u ultrazvučnoj kupelji 20 minuta (Fotografija: M. Marković).

## 10. POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

1. **A** Apsorbancija
2. **DMU** Djevičansko maslinovo ulje
3. **EFSA** Europska agencija za sigurnost hrane
4. **EU** Europska unija
5. **HPLC-UV** Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV detektorom
6. **IOC** International Olive Council (Međunarodno vijeće za masline)
7. **KVB** Kardiovaskularne bolesti
8. **SAD** Sjedinjene Američke Države

## 11. ŽIVOTOPIS

Marija Marković rođena je 06. travnja 2000. godine u Gospiću. Niže razrede osnovne škole pohađala je u Područnoj školi Aleksinica (Osnovna škola dr. Ante Starčevića Pazarište-Klanac), koju je upisala 2006. godine, a više razrede u istoimenoj školi u Klancu, koju je pohađala od 2010. godine. Gimnaziju Gospić upisala je 2014. godine, a nakon završene opće gimnazije i položene državne mature, 2018. godine upisala je preddiplomski stručni studij Sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu. Nakon stjecanja titule stručne prvostupnice sanitarnog inženjerstva, upisala je diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva 2021. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Strukturne formule nekih fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju (Servili i sur., 2013).....	5
<b>Slika 2.</b> Reakcija Fast Blue BB diazonijeve soli s tirosolom u lužnatim uvjetima (Siano i sur., 2022).....	8
<b>Slika 3.</b> Različiti sustavi i sredstva za filtraciju .....	10
<b>Slika 4.</b> Istraživani reakcijski uvjeti Fast Blue BB testa, a) miješanje na horizontalnoj tresilici, b) vorteksiranje na spužvastom nastavku uređaja (Fotografije: M. Marković). .....	16
<b>Slika 5.</b> Reakcijske otopine Fast Blue BB reagensa s rastućim koncentracijama kavske kiseline za kalibraciju i kvantifikaciju (Fotografija: M. Marković).....	17
<b>Slika 6.</b> Kalibracijski pravac za izračun ukupnih fenola. ....	17
<b>Slika 7.</b> Izgled otopina Fast Blue BB reagensa nakon 30 dana čuvanja u hladnjaku (H) i zamrzivaču (Z) (Fotografija: M. Marković).....	18
<b>Slika 8.</b> Maseni udio ukupnih fenola u DMU sorte Leccino ovisno o kombinaciji tehnike i trajanja emulgiranja kod provođenja Fast Blue BB testa. ....	20
<b>Slika 9.</b> Vrijednosti apsorbancija na 420 nm nakon reakcije između kavske kiseline (0,25 mg/mL) i Fast Blue BB reagensa (0,1% m/V) čuvanog 30 dana u hladnjaku (A) i zamrzivaču (B).....	21
<b>Slika 10.</b> Maseni udjeli ukupnih fenola u nefiltriranom i filtriranom DMU sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja određenih Fast Blue BB testom, primjenom <b>vorteksiranja</b> na spužvastom nastavku <b>20 minuta</b> .....	22
<b>Slika 11.</b> Udjeli vode u nefiltriranim i filtriranim DMU sorti Istarska bjelica, Leccino i Rosulja.....	23
<b>Slika 12.</b> Izgled sadržaja epruveta (djevičansko maslinovo ulje i Fast Blue BB reagens u alkalnom pH) nakon emulgiranja u ultrazvučnoj kupelji 20 minuta (Fotografija: M. Marković). ....	36



## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1.</b> Sastav masnih kiselina (iskazan u % od ukupnih masnih kiselina) sortnih djevičanskih maslinovih ulja (prilagođeno prema Koprivnjak i sur., 2012).....	3
<b>Tablica 2.</b> Maseni udio ukupnih tokoferola u sortnim djevičanskim maslinovim uljima (prilagođeno prema Koprivnjak i sur., 2012).....	3
<b>Tablica 3.</b> Maseni udio ukupnih fenolnih tvari u sortnim djevičanskim maslinovim uljima (prilagođeno prema Koprivnjak i sur., 2012).....	5
<b>Tablica 4.</b> Biološka aktivnost i potencijalni zdravstveni učinci fenolnih tvari djevičanskog maslinovog ulja (Šarolić i sur., 2014). ....	6
<b>Tablica 5.</b> Istraživane kombinacije tehnika i trajanja emulgiranja kod Fast Blue BB testa....	15