

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Lucija Rošćić

6812/N

POLIFENOLI SIROVOGA I JESTIVOGA
REPIČINOGA ULJA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Osnove prehrambenih tehnologija

Mentor: doc.dr.sc. Klara Kraljić

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

POLIFENOLI SIROVOGA I JESTIVOGA REPIČINOGA ULJA

Lucija Roščić, 6812/N

Sažetak: Repičino ulje je bogato polifenolnim spojevima koji posjeduju antioksidacijska svojstva tako što hvataju slobodne radikale te usporavaju reakcije oksidacije. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost izolacije čistih polifenolnih spojeva, kanolola i fenilindana, iz sirovoga i jestivoga repičinoga ulja kako bi se mogli naknadno koristiti za istraživanje njihovih svojstava. Polifenolni spojevi izolirani su metanolom i naknadno pročišćeni tankoslojnom kromatografijom. Procesom izolacije je iz 240 g sirovoga repičinoga ulja izolirano 26,57 mg kanolola pri čemu iskorištenje procesa iznosi 52,55%. Za izolaciju fenilindana je korišteno 720 g sirovoga repičinoga ulja te je izolirano 6,43 mg navedenog spoja. Iskorištenje procesa izolacije fenilindana iznosi 56,15%. Čistoća proizvedenih ekstrakata je visoka te za ekstrakt sirovog repičinog ulja iznosi 97,7% dok za jestivo repičino ulje iznosi 88,6%. Na temelju dobivenih vrijednosti se može zaključiti da se sirovo repičino ulje može koristiti za izolaciju kanolola, a jestivo repičino ulje za izolaciju fenilindana.

Ključne riječi: uljana repica, repičino ulje, polifenoli, kanolol, fenilindan

Rad sadrži: 24 stranice, 5 slika, 3 tablice, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Klara Kraljić

Rad predan: rujan 2016.

DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

POLYPHENOLS OF CRUDE AND REFINED RAPESEED OIL

Lucija Roščić, 6812/N

Abstract: Rapeseed oil is rich in polyphenols, compounds with radical scavenging activity that can slow down oxidation reactions. The aim of this work was to determine a possibility of isolation of polyphenol compounds, canolol and phenylindane in crude and refined rapeseed oil. Methanol was used for extraction and thin-layer chromatography was used for purification. For isolation of canolol was used 240 g of crude rapeseed oil from which was isolated 26,57 mg of canolol. Process yield for canolol was 52,55%. For isolation of phenylindane was used 720 g of refined rapeseed oil from which was isolated 6,43 mg of phenylindane. Process yield for phenylindane was 56,15%. Purity of extracts was high; for crude rapeseed oil extract it was 97,7% and for refined rapeseed oil extract it was 88,6%. Based on the given data it can be concluded that crude rapeseed oil can be used for isolation of canolol and refined rapeseed oil can be used for isolation of phenylindane.

Keywords: rapeseed, rapeseed oil, polyphenols, canolol, phenylindane

Thesis contains: 24 pages, 5 figures, 3 tables, 50 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Klara Kraljić, Assistant professor

Thesis defended: September 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Uljana repica	2
2.2. Polifenoli	3
2.2.1. Polifenoli uljane repice	5
2.2.2. Polifenoli u repičinom ulju	7
2.2.3. Utjecaj polifenolnih spojeva repičinoga ulja na zdravlje	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali.....	10
3.2. Metode rada	10
3.2.1. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju	10
3.2.2. Izolacija polifenolnih spojeva iz sirovoga i jestivoga repičinoga ulja	12
3.2.3. Izračunavanje iskorištenja procesa izolacije fenolnih spojeva.....	13
4. REZULTATI	14
5. RASPRAVA	16
6. ZAKLJUČAK	19
7. LITERATURA	20

1. UVOD

Uljana repica je jedna od najznačajnijih uljarica u Hrvatskoj, ali i u svijetu. Upotrebljava se kao sirovina u prehrambenoj ali i u farmaceutskoj industriji, kao stočna hrana te predstavlja osnovnu sirovinu za proizvodnju biodizel goriva.

Podrijetlom iz Indije poznata je više od 3000 godina, a značajnija kultivacija u Europi započinje tek u 13. stoljeću. Površine zasijane uljanom repicom u svijetu porasle su u posljednjih desetak godina, a najveći proizvođači uljane repice su Kina, s više od 7 milijuna hektara, Indija, s više od 6 milijuna hektara, te Kanada, s više od 4 milijuna hektara godišnje.

Sjeme uljane repice sadrži 18-25 % bjelančevina s povoljnim odnosom aminokiselina te 40-48 % ulja s visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina. Repičino ulje predstavlja važan izvor nutritivno visokovrijednih tvari jer sadrži značajan udjel oleinske masne kiseline (oko 60%). Uz to, repičino ulje sadrži oko 11 % omega-3 (α -linolenske) te oko 20 % omega-6 masnih kiselina (linolne) što zapravo predstavlja gotovo idealan omjer (1:2).

Uz povoljan omjer masnih kiselina, repičino ulje sadrži značajnu koncentraciju tokoferola i sterola te sadrži i polifenole, spojeve koje djeluju kao antioksidansi te sprječavaju reakcije oksidacije i kao takvi poboljšavaju stabilnost samoga ulja, ali i pozitivno utječu na zdravlje. 4-vinilsiringol, poznat i kao kanolol, specifičan je spoj sirovoga repičinoga ulja i dokazano je kako snižava razinu reaktivnih kisikovih vrsta i sprječava oksidativni stres koji se povezuje s nizom bolesti poput tumora, kardiovaskularnih bolesti, arteroskleroze i Alzheimerove bolesti. Tijekom rafinacije repičinoga ulja, dolazi do dimerizacije kanolola te nastaje fenilindan. Fenilindan je dominantni fenolni spoj u jestivom repičinom ulju, a dokazana je i njegova jaka antioksidacijska aktivnost.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost izolacije specifičnih polifenolnih spojeva sirovoga i jestivoga repičinoga ulja kako bi se mogli koristiti kod istraživanja bioaktivnih svojstava tih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Uljana repica

Uljana repica je jednogodišnja biljka koja pripada rodu krstašica (*Brassica*) porodice Cruciferae, a za proizvodnju ulja su značajne vrste *Brassica campestris* L., *Brassica napus* L. i *Brassica rapa* L. Biljka uljane repice visoka je 1,5 m s uskim komuškama duljine 5 do 10 cm. Sjemenke su smeđe-crne boje, veličine 1,8 do 2,8 mm (Karačić i sur., 2002). Sjeme uljane repice sadrži 40-48% ulja, 18-25% proteina, 6-10% vode, 5-8% celuloze te 3-5% pepela (Gadžo i sur., 2011).



Slika 1. *Brassica napus* subspec. *olifera* (Anonymous, 2016)

Zbog sve veće primjene uljane repice, ona zamjenjuje suncokret i soju na hladnijim i vlažnijim područjima (Kraljević i sur., 2008). Tako se u hladnijim područjima uzgajaju jari kultivari dok se u umjerenijim područjima uzgajaju ozimi kultivari.

Stari kultivari uljane repice su u ulju sadržavali i do 50% eruka masne kiseline (C22:1) te visoke koncentracije glukozinolata u sačmi koji negativno utječu na zdravlje (Marjanović-Jeromela i sur., 2011). U cilju smanjenja koncentracije navedenih spojeva, ali i poboljšanja prinosa sjemena, ulja i sačme, početkom 20. stoljeća se počelo raditi na oplemenjivanju uljane

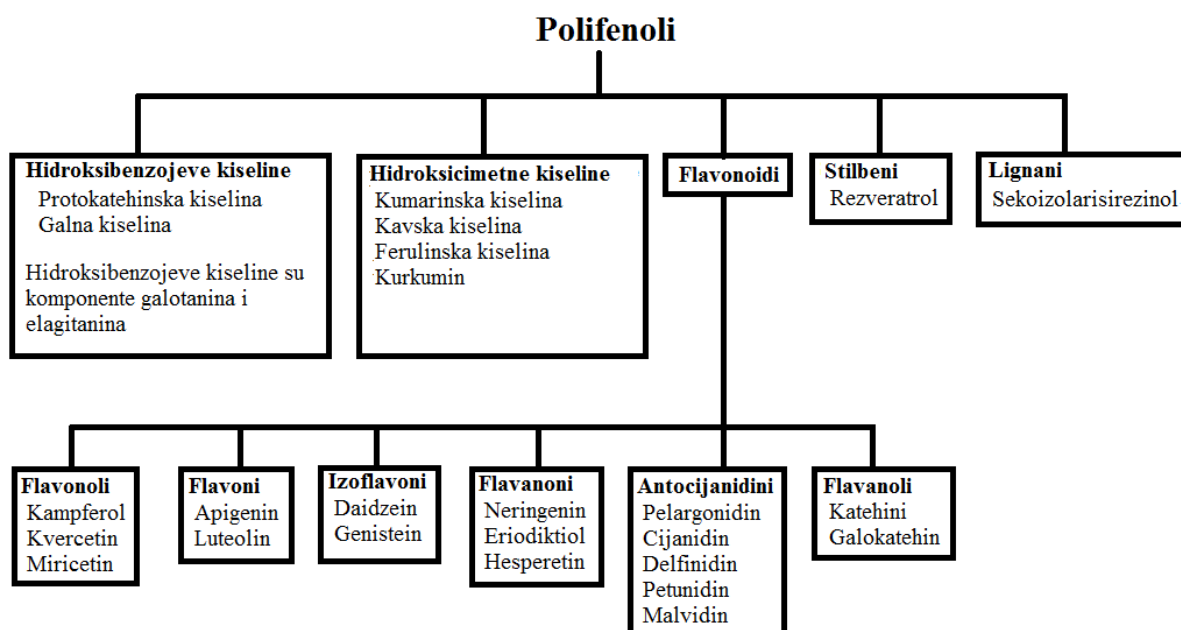
repice (Kozumplik i Martinić-Jerčić, 2000). Kao rezultat oplemenjivanja su dobiveni kultivari koji sadrže manje od 2% eruka masne kiseline u ulju te 15-20 mmol g⁻¹ glukozinolata u odmašćenoj sačmi ("00" kultivari).

Prema sastavu aminokiselina, uljana repica je slična punomasnoj soji, međutim soja sadrži više lizina dok sjemenke uljane repice sadrže više sumpornih aminokiselina (Aherne i Kenelly, 1985). Od pojedinačnih aminokiselina, sjemenke uljane repice sadrže 10,0-16,9 g kg⁻¹ asparaginske kiseline, 5,5-10,0 g kg⁻¹ treonina, 5,6-9,9 g kg⁻¹ serina, 23,4-38,2 g kg⁻¹ glutaminske kiseline, 1,8-16,4 g kg⁻¹ prolina, 6,5-12,2 g kg⁻¹ glicina, 3,2-11,0 g kg⁻¹ alanina, 7,8-12,5 g kg⁻¹ valina, 1,6-4,4 g kg⁻¹ metionina, 5,7-9,5 g kg⁻¹ izoleucina, 9,9-16,7 g kg⁻¹ leucina, 4,1-6,6 g kg⁻¹ tirozina, 5,8-9,7 g kg⁻¹ fenilalanina, 4,0-6,5 g kg⁻¹ histidina, 10,1-14,6 g kg⁻¹ lizina te 10,2-16,9 g kg⁻¹ arginina. Iako postoji razlika u zastupljenosti pojedinačnih aminokiselina kod različitih kultivara uljane repice, omjer esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina je otprilike jednak kod različitih kultivara i kreće se u rasponu od 1,0-1,2 (Straková i sur., 2008).

Repičino ulje sadrži visoki udio mononezasićenih masnih kiselina (44-75%), 22-35% polinezasićenih masnih kiselina te vrlo malo zasićenih masnih kiselina (5-10%). Od polinezasićenih masnih kiselina 18-22% čini omega-6 masna kiselina (linolna kiselina), a 9-13% omega-3 masna kiselina (α -linolenska kiselina) što predstavlja gotovo idealan omjer za zdravlje (Szydłowska-Czerniak i sur., 2010). Osim dobrog sastava aminokiselina i masnih kiselina, sjeme uljane repice je bogato i fenolnim spojevima u koncentraciji od 6,4-12,8 g kg⁻¹ (Naczki i sur, 1997).

2.2. Polifenoli

Polifenoli čine najrašireniju skupinu prirodnih spojeva u biljnom svijetu s preko 8,000 poznatih struktura. Po kemijskoj strukturi su građeni od aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Oni se klasificiraju prema podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi (Tsao, 2010).



Slika 2. Podjela polifenolnih spojeva i najznačajniji predstavnici pojedinih grupa (Hardman, 2014)

Fenolne kiseline se nalaze u velikoj koncentraciji u hrani te su podijeljene u dva razreda: derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline. Koncentracija hidroksibenzojevih kiselina je u jestivim biljkama vrlo niska, dok su hidroksicimetne kiseline učestalije te se većinom mogu naći *p*- kumarinska, kavaska, ferulinska i sinapinska kiselina.

Flavonoidi su grupa polifenola čija osnovna struktura sadrži dva aromatska prstena povezana s tri ugljikova atoma. Identificirano je više od 4,000 vrsta flavonoida te su, na temelju varijacija u strukturi, podijeljeni u šest podrazreda: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antocijanini i izoflavoni. Individualne razlike su posljedica razlika u broju i položaju hidroksilnih grupa te alkilacije i glikolizacije istih (Pandey i Rizvi, 2009).

Stilbeni su spojevi koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu te je najpoznatiji predstavnik ove skupine resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Lignani su difenolni spojevi koji imaju 2,3-dibenzilbutansku strukturu koja nastaje dimerizacijom dviju cimernih kiselina (Pandey i Rizvi, 2009).

2.2.1. Polifenoli uljane repice

Od svih uljarica, uljana repica sadrži najviše fenolnih spojeva (Nowak i sur., 1992), a najveći udio fenolnih spojeva čine esterificirane fenolne kiseline (oko 80%) sa sinapienom kao najvažnijim predstavnikom. Slobodne fenolne kiseline čine 9-16% ukupnih fenolnih spojeva, a najvažniji predstavnik ove skupine je sinapinska kiselina (Shahidi i Naczk, 1992).

2.2.1.1. Fenolne kiseline

U uljanoj repici detektirane su i hidroksicimetne i hidroksibenzojeve fenolne kiseline a prisutne su u slobodnom te u esterificiranom obliku. *Trans*-sinapinska kiselina je dominantna fenolna kiselina uljane repice, a prisutnost *cis*-sinapinske kiseline je posljedica izomerizacije uzrokovane izlaganju sjemenki repice UV zračenju (Schulz i Hermann, 1980).

Slobodne fenolne kiseline

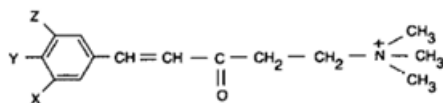
Sačma uljane repice sadrži preko 2 g slobodnih fenolnih kiselina po kilogramu sačme (Naczk i sur., 1992) pri čemu sinapinska kiselina čini od 70 do 85 % ukupnih slobodnih fenolnih kiselina. Osim sinapinske kiseline, u malim koncentracijama su prisutne i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska, gentska, protokatehinska, siringinska, *p*-kumarinska, *cis*- i *trans*-ferulinska, kavaska i klorogenska kiselina (Krygier i sur., 1982; Kozłowska i sur., 1991).

Esterificirane fenolne kiseline

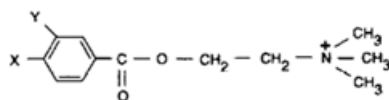
Esterificirane fenolne kiseline su dominantna frakcija fenolnih kiselina prisutnih u repici i čine 80% ukupnih fenolnih kiselina. Sinapinska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u esterima s 71 do 97%. Osim sinapinske kiseline, alkalni hidrolizati fenolnih estera sadrže i male koncentracije *p*-hidroksibenzojeve kiseline, vanilinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, *cis*- i *trans*-ferulinske te kavske kiseline (Krygier i sur., 1982).

U sjemenkama biljaka koje pripadaju porodici *Brassicaceae* je prisutan veliki broj kolin estera fenolnih kiselina, odnosno sinapina. Sastav fenolnih kiselina u sinapinima je genski

kontroliran, ali njihov sastav je i pod utjecajem uvjeta uzgoja (Bouchereau i sur., 1991). U repici su prisutni sinapini poput sinapoilkolina, feruloilkolina, izoferuloilkolina, kumaroilkolina, 4-hidroksibenzoilkolina te 3,4-dimetoksibenzoilkolina (Larsen i sur., 1983).



Sinapini	X	Y	Z
Kumaroilkolin	H	OH	H
Feruloilkolin	H	OH	OCH ₃
Izoferuloilkolin	H	OCH ₃	OH
Sinapin	OCH ₃	OH	OCH ₃
Sinapin glukozid	OCH ₃	O-Glu	OCH ₃



Sinapini	X	Y
4-hidroksibenzoilkolin	OH	H
Hesperalin	OCH ₃	OCH ₃

Slika 3. Strukturne formule sinapina prisutnih u uljanoj repici (Naczki i sur., 1997)

Osim sinapina u repici su pronađeni i drugi fenolni esteri poput metilnih estera *cis*- i *trans*-ferulinske kiseline čija je prisutnost u repici potvrđena masenom spektrometrijom (Fenton i sur., 1980). Osim toga, u repici su prisutni glikozidi poput 3-(O-sinapoil soforozid)-7-O-glukozida kampferola i 3-(O-sinapoil glukozid)-7-O-soforozida kampferola (Tantawy i sur., 1983), dok je 1-O-β glukopiranozil sinapad dominantni glikozid u repici (Amarowicz i sur., 1995).

2.2.1.2. Kondenzirani tanini

Tanini su kompleksni fenolni spojevi s molekulskom masom od 500 do 3000 Da te se klasificiraju kao kondenzirani ili hidrolizirajući. Hidrolizirajući tanini su fenoli koji kiselom, alkalnom ili enzimskom hidrolizom proizvode polihidroksilne jedinice poput D-glukoze te fenolne kiseline poput galne i/ili heksahidroksidifenske kiseline. S druge strane, kondenzirani

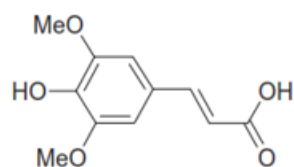
tanini su dimeri, oligomeri ili polimeri flavan-3-ola iz kojih kiselinskom hidrolizom nastaju antocijanidini te su zbog toga poznati kao proantocijanidini (Naczki i sur., 1997). Uz to, sirovi polifenolni ekstrakti ljuske uljane repice sadrže otprilike 20% proantocijanidina topljivih u etil acetatu što znači da se radi o monomerima i dimerima proantocijanidina (Naczki i sur., 1994).

Kondenzirani tanini su identificirani u ljusci uljane repice (Bate-Smith i Ribereau-Gayon, 1959). Uključuju cijanidin, pelargonidin i n-butil derivat cijanidina (Durkee, 1971), a osnovna jedinica tanina izoliranih iz ljuske uljane repice je leukocijanidin (Leung i sur., 1979). U ljusci repice se nalazi 0,02-0,22% kondenziranih tanina, odnosno 0,14-23 g tanina po kilogramu ljuske, a razlika u koncentraciji tanina je posljedica razlika među kultivarima te uvjetima uzgoja (Mitaru i sur., 1982).

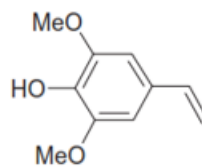
2.2.2. Polifenoli u repičinom ulju

Kao što je prethodno napisano, sinapinska kiselina je dominantna fenolna kiselina u uljanoj repici dok se u manjim koncentracijama nalaze i druge kiseline poput ferulinske, *o*- i *p*-kumarinske kiseline. Navedene kiseline se mogu pronaći i u hladno prešanom repičinom ulju u koncentraciji od 3-4 mg kg⁻¹ (Koski i sur., 2002). U sirovom repičinom ulju je pronađen i dekarboksilirani oblik sinapinske kiseline, odnosno 2,6-dimetoksi-4-vinilsiringol (kanolol) koji nastaje zbog povišenja temperature u procesu proizvodnje repičinoga ulja (Koski i sur., 2003; Wakamatsu i sur., 2005). Kanolol je glavni fenolni spoj u sirovom repičinom ulju te je, zbog svoje funkcionalne grupe, prekursor u formiranju novih fenolnih spojeva koji nastaju u procesu rafinacije repičinoga ulja (Koski i sur., 2003; Vourela i sur., 2003).

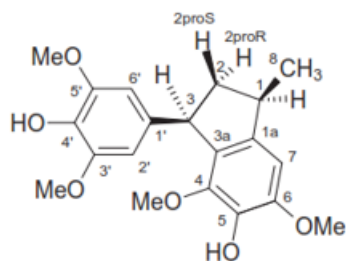
Tijekom neutralizacije u procesu rafinacije ukupna koncentracija polifenola u ulju se značajno smanjuje te iznosi 15% koncentracije koja se nalazi u sirovom repičinom ulju, a kanolol se tijekom dezodorizacije skoro u potpunosti ukloni (Zacchi i Eggers, 2008). No u postupku rafinacije dimerizacijom kanolola nastaju *cis*- i *trans*- dijastereoizomeri fenilindana [*cis*-4,6-dimetoksi-5-hidroksi-1-metil-3-(30,50-dimetoksi-40-hidroksifenil)indan] i [*trans*-4,6-dimetoksi-5-hidroksi-1-metil-3-(30,50-dimetoksi-40-hidroksifenil)indan]. Fenilindan se u komercijalno dostupnom repičinom ulju nalazi u vrlo maloj koncentraciji, tj. u koncentraciji od 63,0 mg kg⁻¹ (Harbaum-Piayda i sur., 2010).



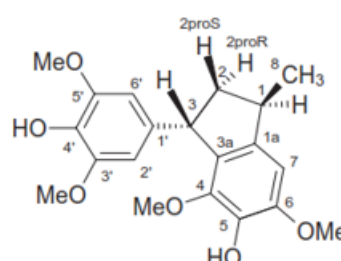
Sinapinska kiselina



Kanolol



cis-dijastereoizomer
fenilindana



trans-dijastereoizomer
fenilindana

Slika. 4. Struktura sinapinske kiseline, kanolola, *cis*- i *trans*-diastereoizomera fenilindana (Harbaum-Piayda i sur., 2010)

2.2.3. Utjecaj polifenolnih spojeva repičinoga ulja na zdravlje

Slobodni radikali su molekulske vrste koje sadrže nespareni elektron u atomskoj orbitali te se svrstavaju u vrlo nestabilne i reaktivne molekule. Slobodni radikali mogu donirati ili primiti elektron odnosno ponašaju se kao oksidansi ili reducensi. Najvažniji slobodni radikali koji sadrže kisik, a uzrokuju različita oštećenja su hidroksilni radikal, superoksidni radikal, vodikov peroksid, singlet kisika, hipoklorit, radikal nitratnog oksida i peroksinitratni radikal. Navedeni spojevi uzrokuju oštećenja molekula poput DNA, proteina, ugljikohidrata te lipida (Young i Woodside, 2001). U tijelu slobodni radikali nastaju tijekom osnovnih metaboličkih procesa ili pod utjecajem vanjskih faktora poput pušenja cigareta, izlaganja zračenju, zagađivačima, industrijskim kemikalijama itd. (Bagchi i Puri, 1998).

Oksidativni stres je stanje koje je posljedica disbalansa između proizvodnje i eliminacije slobodnih radikala (Mc Cord, 2000). Kratkotrajni oksidativni stres može nastati zbog traume, infekcije, toksina, pretjeranog vježbanja i drugog. Ozlijeđena tkiva proizvode enzime kao što su lipogenaza, ksantin oksidaza ili ciklooksidaza koji proizvode slobodne radikale. Neke od posljedica oksidativnog stresa uključuju inicijaciju, promociju i progresiju

tumora, utjecaj na dijabetes i neurodegenerativne bolesti poput Parkinsonove bolesti (Rao i sur., 2006).

Epidemiološke studije pokazuju povezanost između smanjenja rizika od nastanka kroničnih bolesti i konzumacije hrane bogate polifenolima. Fenolne strukture u polifenolima mogu prihvatiti elektron, formirati relativno stabilan fenoksilni radikal te prekinuti reakcije oksidacije u stanicama (Pandey i Rizvi, 2009).

Polifenoli repičinoga ulja su odlični hvatači slobodnih radikala te kanolol ima veliki antiradikalni kapacitet protiv endogenog mutagena peroksinitrita (Kuwahara i sur., 2004). Kanolol čini većinu polifenola sirovoga repičinoga ulja (87%) te u smjesi sa sinapinskom kiselinom i derivatima ima veću antioksidacijsku aktivnost nego kad se nalazi sam što ukazuje na sinergistički efekt polifenola repičinoga ulja. Polifenoli repice pokazuju odlična antioksidativna svojstva prema oksidaciji liposoma što je u repičinom ulju rezultat prisutnosti kanolola, a u sačmi repice rezultat prisutnosti sinapinske kiseline (Vourela i sur., 2005). Sirovo repičino ulje ima sposobnost inhibicije formiranja nitratnog oksida i prostaglandina E₂ što znači da posjeduje antiinflamatorna svojstva. S druge strane, polifenoli sačme repice ne posjeduju antiinflamatorna svojstva. Na temelju toga se može zaključiti da je za antiinflamatorna svojstva repičinoga ulja zaslužan je kanolol koji inhibira formiranje nitratnog oksida i prostaglandina E₂ (Vourela i sur., 2005).

Oralnom konzumacijom kanolola se smanjuje kronični gastritis povezan s *Helicobacter pylori* te s pojavom tumora želuca. Kanolol smanjuje razinu anti-*H. pylori* IgG antitijela i gastrina u serumu, ali ne smanjuje kolonizaciju *H. pylori* (Cao i sur., 2008). Ekstrakti sjemenki uljane repice i kanolol pokazuju antimutagena svojstva u prokariotskim stanicama te je antimutageni potencijal kanolola viši od nekih drugih flavonoida kao i od α -tokoferola (Kuwahara i sur., 2004).

Tijekom neutralizacije u procesu rafinacije sirovoga repičinoga ulja nastaje fenilindan, elektrofilnom aromatskom supstitucijom u kiselim uvjetima. Fenilindan je dominantni fenolni spoj u jestivom repičinom ulju te čini dvije trećine ukupnih fenolnih spojeva (Kraljić i sur., 2015). Fenilindan ima skoro dvostruko veći antioksidativni potencijal od kanolola što govori da obje hidroksilne grupe pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Antioksidacijska aktivnost fenilindana je usporediva s antioksidacijskom aktivnošću kvercetina, važnog flavanola u voću i povrću. Kvercetin je jaki antioksidans koji zaustavlja lipidnu oksidaciju tako što reagira sa slobodnim radikalima. Slične antioksidacijske aktivnosti kvercetina i fenilindana ukazuju na važnost fenilindana u zaustavljanju reakcija oksidacije u hrani (Harbaum-Piayda, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za izradu ovog rada korišteno je sirovo te jestivo repičino ulje proizvođača Zvijezda d.d., Zagreb. Za analizu i izolaciju polifenolnih spojeva korišteni su slijedeći reagensi: metanol, acetonitril, fosforna kiselina, heksan i dietil eter te standardi, hidroksitirozol, protokatehinska kiselina, tirozol, 4-hidroksibenzojeva kiselina, klorogenska kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, vanilin, siringaldehid, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, sinapinska kiselina i *trans*-cimetna kiselina (sve HPLC čistoće).

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju

Metoda korištena za određivanje polifenolnih spojeva je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV detekciju (DAD detektor). U tu je svrhu uzorak pripremljen modificiranom metodom Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2009).

U epruvetu od 10 mL je odvaženo 4,0 g repičinoga ulja te se doda 5 mL 80%-tne otopine metanola i miješa na vorteksu točno 1 minutu. Polifenoli se ekstrahiraju pomoću ultrazvučne kupelji na sobnoj temperaturi 15 minuta te se nakon toga uljna i metanolna faza odjele na centrifugi pri 5000 okretaja min^{-1} kroz 25 minuta. Alikvot supernatanta se filtrira kroz 0,45 μm PVDF filter.

U HPLC sustav Varian ProStar System se injektira 20 μL pripremljenog polifenolnog ekstrakta te se snime kromatogrami na 280 nm koristeći ProStar 330 UV-Vis DAD detektor. Za razdvajanje polifenolnih spojeva korištena je gradijentna elucija (Tablica 1), a samo razdvajanje je provedeno na RPC18 koloni Luna, Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 μm) pri sobnoj temperaturi.

Tablica 1. Eluacijski gradijent za određivanje polifenola HPLC/DAD metodom

Vrijeme (min)	Protok (mL min ⁻¹)	0,2% otopina H ₃ PO ₄ (%)	Metanol (%)	Acetonitril (%)
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

Identifikacija polifenolnih spojeva provodi se usporedbom retencijskih vremena razdvojenih pikova (R_t) s vremenom zadržavanja standarda: hidrositiosola, tirosola, protokatehinske, 4-hidroksibenzojeve, klorogenske, vanilinske, siriginske, *p*-kumarinske, ferulinske, sinapinske i *trans*-cimetne kiseline te vanilina i siringaldehida.

Udio polifenolnih spojeva u ekstraktu je određen prema baždarnoj krivulji za izračunavanje udjela sinapinske kiseline u ulju [1], dok je za određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ulju (mg kg⁻¹) korištena formula [2].

$$y = 172456x - 5685,2 \quad [1]$$

gdje je:

y = površina ispod pika

x = koncentracija sinapinske kiseline (μg mL⁻¹)

$$c(\text{fenolni spoj}) = \frac{x \cdot V}{m} \quad [2]$$

gdje je:

x = koncentracija fenolnog spoja (μg mL⁻¹)

V = volumen otopina 80%-tne otopine metanola korištenog za ekstrakciju (5 mL)

m = masa uzorka ulja uzetog za analizu (g)

3.2.2. Izolacija polifenolnih spojeva iz sirovoga i jestivoga repičinoga ulja

Ekstrakcija polifenolnih spojeva provedena je prema metodi koju su u svom radu objavili Kraljić i suradnici (2015). U plastične kivete od 50 mL se odvaže po 20 g ulja, doda se 10 mL metanola te se začepljena kiveta miješa 1 minutu na vorteksu (tip 2, IKA). Ekstrakcija se provodi u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex digiplus) 15 minuta a uljni i metanolni sloj odvoje se kroz 25 minuta na centrifugi (5000 o min⁻¹, Rotina 380R). Gornja, metanolna faza se odvoji u okruglu tikvicu, a s preostalom uljnom fazom se postupak ekstrakcije ponovi još 2 puta. Ekstrakcija se provodi nekoliko puta kako bi se skupila dovoljna količina ekstrakta, a svi se metanolni ekstrakti skupljaju u istu tikvicu, metanol se otpari na rotacijskom vakuum uparivaču (Advantage HL, Heidolph).

Dobiveni suhi polifenolni ekstrakt otopi se u 100 mL acetonitrila (u obrocima) te se prebaci u lijevak za odjeljivanje. Zatim se u tikvicu doda 50 mL heksana, ispere i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Nakon miješanja, lijevak za odjeljivanje se ostavi obložen aluminijskom folijom kako bi se odvojile acetonitrilna i heksanska faza. Donja, acetonitrilna faza ispusti se u drugi lijevak za odjeljivanje, a u preostalu heksansku fazu se još 2 puta doda po 20 mL acetonitrila. Sve acetonitrilne faze se skupe u drugom lijevku za odjeljivanje te se na kraju isperu s 50 mL heksana kako bi se uklonili eventualni zaostaci ulja. Acetonitrilna faza je zatim ispuštena u tikvicu s okruglim dnom te je uparena do suha na rotacijskom vakuum uparivaču (Advantage HL, Heidolph).

Polifenolni spojevi ekstrahirani iz repičinoga ulja pročiste se na pločama za tankoslojnu kromatografiju (TLC, Kieselgel 60 HF₂₅₄) pri čemu se kao mobilna faza koristi smjesa heksana i dietil etera (8/3, v/v). UV-vidljive vrpce na R_f 0,13 (za polifenolni ekstrakt iz sirovoga repičinoga ulja) te R_{f,1} 0,08 (za polifenolni ekstrakt iz jestivoga repičinoga ulja) su sastrugane, a spojevi su isprani sa silikagela koristeći acetonitril.

Izolati polifenola su otopljeni u 10 mL metanola te su napravljena razrjeđenja (100x za izolat sirovoga ulja i 20x za izolat jestivoga ulja). U pripremljenim razrjeđenim otopinama određen sastav i udjel polifenola po metodi opisanoj u potpoglavlju 3.2.1. Određivanje polifenola HPLC metodom uz UV detekciju.

3.2.3. Izračunavanje iskorištenja procesa izolacije fenolnih spojeva

Koristeći koncentracije polifenola u sirovom i jestivom repičinom ulju te koncentracije otopina njihovih izolata izračunate su mase spojeva (kanolol i fenilindan) koje teoretski mogu biti izolirane te stvarne izolirane mase. Dobiveni podatci su korišteni za izračunavanje iskorištenja procesa izolacije polifenolnih spojeva, a samo iskorištenje je definirano kao masa izoliranog spoja u odnosu na masu spoja prisutnog u ulju (forumula 3).

$$\text{iskorištenje (\%)} = \frac{m_{stv}}{m_{teor}} \cdot 100 \quad [3]$$

pri čemu je:

m_{stv} – stvarna masa izoliranog spoja

m_{teor} – masa spoja prisutna u ulju korištenom za izolaciju

4. REZULTATI

U ovom istraživanju proveden je proces izolacije fenolnih spojeva iz sirovoga i jestivoga repičinoga ulja. Prije izolacije uljima je određen polifenolni sastav i rezultati su prikazani u tablici 2. Nakon izolacije kanolola i fenilindana iz sirovoga odnosno jestivoga repičinoga ulja izračunata su iskorištenja procesa izolacije. Rezultati su prikazani u tablici 3.

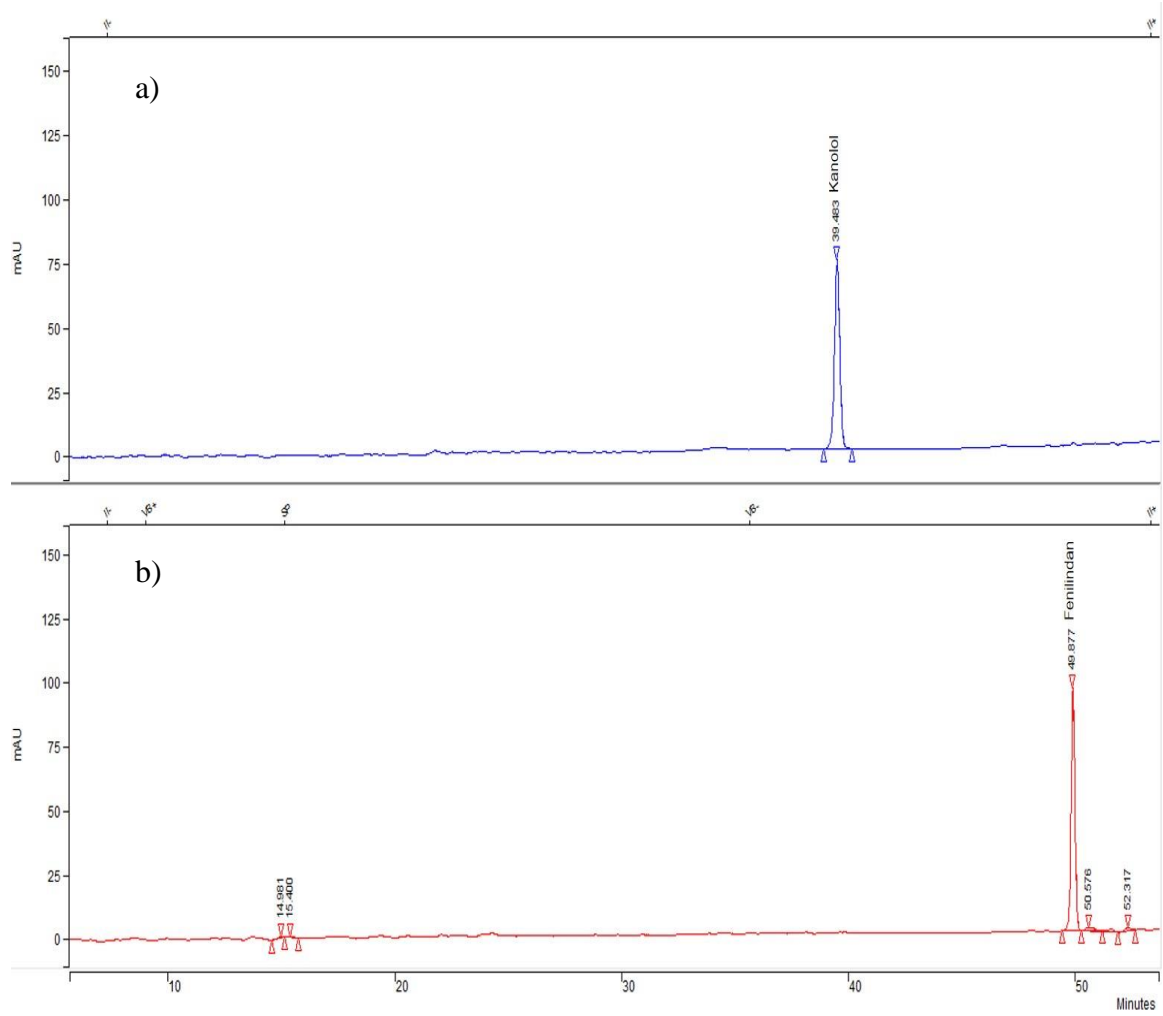
Proizvedeni ekstrakti analizirani su tekućinskom kromatografijom kako bi se ispitala njihova čistoća a kromatogrami ekstrakata sirovoga i jestivoga repičinoga ulja prikazani su na slici 5.

Tablica 2. Udio fenolnih spojeva u sirovom i jestivom repičinom ulju

Spoj (mg kg⁻¹)	Sirovo repičino ulje	Jestivo repičino ulje
Kanolol	202,35	nd
Fenilindan	nd	16,62
Ukupni fenoli	229,90	41,92

Tablica 3. Iskorištenje procesa izolacije fenolnih spojeva

Ekstrakti	Masa ulja za izolaciju (kg)	Teorijska masa spoja (mg)	Stvarna masa izoliranog spoja (mg)	Iskorištenje (%)
Kanolol	0,24	48,65	26,57	52,55
Fenilindan	0,72	11,45	6,43	56,15



Slika 5. Kromatogrami ekstrakata polifenola a) sirovoga repičinoga ulja i b) jestivoga repičinoga ulja

5. RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati mogućnost izolacije čistih polifenolnih spojeva iz repičinoga ulja kako bi se mogli naknadno koristiti za istraživanje njihovih svojstava. Polifenolni spojevi su bitni sastojci ulja zato što usporavaju reakcije oksidacije. Reakcije oksidacije su jedan od najčešćih uzroka kvarenja ulja, a do oksidacije dolazi tijekom proizvodnje kao i skladištenja ulja. Lipidna oksidacija je glavni uzročnik smanjenja kvalitete hrane, a produkti reakcija oksidacije utječu na senzorske karakteristike hrane kao i na gubitak nutrijenata i bioaktivnih tvari. Posljedica oksidacijskih procesa je to da hrana postaje neprikladna za konzumaciju. Lipidi su podložni oksidaciji u prisutnosti svjetlosti, topline, enzima, metala, metaloproteina te mikroorganizama što dovodi do procesa autooksidacije, termoksidacije, fotooksidacije te enzimске oksidacije. Autooksidacija je najčešće prisutan oblik oksidacije, a posljedica je spontane reakcije lipida s atmosferskim kisikom preko niza reakcija, a proces može biti ubrzan povišenjem temperature. Nezasićene masne kiseline su glavni supstrati u navedenim reakcijama (Shahidi i Zhong, 2010).

Antioksidansi su tvari prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s tvarima koje se oksidiraju, a djeluju tako što sprječavaju ili usporavaju njihovu oksidaciju. Antioksidansi su široko rasprostranjeni u biljnom i životinjskom tkivu te mikroorganizmima, a mogu biti izolirani iz prirodnih izvora poput voća, povrća, sjemenki, žitarica, ulja i slično. Polifenolni spojevi su važna grupa antioksidansa te su prirodno prisutni većinom u biljkama.

Za izolaciju polifenolnih spojeva u ovom radu je korišteno sirovo i jestivo repičino ulje proizvođača Zvijezda d.d., Zagreb. Prije izolacije polifenolnih spojeva su određeni njihov sastav i koncentracije u navedenim uljima. Najzastupljeniji spoj sirovog repičinog ulja je kanolol i čini 88,02% ukupnih fenolnih spojeva sirovog repičinog ulja. Njegova koncentracija iznosi 229,90 mg kg⁻¹ ulja što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Spielmeyer i suradnici (2009) u kojem navode da je kanolol u sirovim uljima prisutan u koncentracijama od 5,7 do 720 mg kg⁻¹. S druge strane, koncentracija kanolola u ovom radu je manja od koncentracije koju su Wakamatsu i suradnici (2005) dobili u svom istraživanju, a koja iznosi od 549 do 1536 mg kg⁻¹. Kanolol nastaje dekarboksilacijom sinapinske kiseline tijekom zagrijavanja sjemena uljane repice, i njegova koncentracija u ulju značajno ovisi o upotrijebljenoj temperaturi. Optimalna temperatura zagrijavanja sjemena je 160°C (Wakamatsu i sur., 2005). Međutim, u istraživanju koje su proveli Siger i suradnici (2015) je zaključeno da je najveća koncentracija

kanolola pronađena u ulju proizvedenom iz sjemena koje je zagrijavano na temperaturi od 180°C tijekom 15 minuta. Povećana koncentracija kanolola, u usporedbi s uljem dobivenim od sjemena koje nije zagrijavano, uzrokuje povećanje antioksidativne aktivnosti. Zagrijavanje sjemena uljane repice rezultira povećanom nutritivnom vrijednošću kao i povećanom oksidacijskom stabilnošću samoga ulja (Siger i sur., 2015).

U postupcima rafinacije ulja, točnije tijekom degumiranja se gubi manja količina kanolola dok se veliki gubitak navedenog spoja događa tijekom bijeljenja i deodorizacije (Chen i sur., 2014; Zacchi i Eggers, 2008). Tijekom postupka neutralizacije koncentracija kanolola je značajno smanjena, dok u postupku bijeljenja smanjenje koncentracije kanolola ovisi o vrsti i koncentraciji upotrijebljene zemlje za bijeljenje (Zacchi i Eggers, 2008).

Tijekom rafinacije nestaje kanolol, ali dolazi do sinteze fenilindana koji je u ulju prisutan u značajno nižim koncentracijama nego kanolol. Koncentracija fenilindana u ovom radu iznosi 16,62 mg kg⁻¹ ulja te čini 39,65% ukupnih fenolnih spojeva rafiniranoga repičinoga ulja. Ovi su rezultati u skladu s istraživanjem koje su proveli Harbaum-Piayda i suradnici (2010) kod kojih koncentracija fenilindana iznosi od 6,4 do 63,0 mg kg⁻¹.

U ovom radu je za izolaciju kanolola korišteno sirovo repičino ulje dok je za izolaciju fenilindana korišteno jestivo repičino ulje. Za izolaciju kanolola koristilo se 240 g sirovoga repičinoga ulja, a za izolaciju fenilindana se koristilo 720 g jestivoga repičinoga ulja. Za izolaciju fenilindana je bilo potrebno znatno više ulja zato što jestivo repičino ulje sadrži manje fenilindana nego što sirovo repičino ulje sadrži kanolola. Iskorištenje procesa izolacije kanolola iznosi 52,55% dok iskorištenje procesa izolacije fenilindana iznosi 56,15%. Povećanje iskorištenja procesa izolacije bi se moglo poboljšati korištenjem različitih otapala, a pročišćavanje bi bilo uspješnije koristeći preparativni HPLC (Harbaum-Piayda, 2010). Osim toga, bolja izolacija polifenolnih spojeva bi se mogla postići korištenjem SPE kolona (Solid Phase Extraction) punjenih diolom. Proces započinje kondicioniranjem kolone s metanolom i *n*-heksanom, zatim se unosi uzorak otopljen u *n*-heksanu. Poslije toga se kolona ispiru smjesom *n*-heksana i etil acetata u omjeru 90:10, v/v te na kraju slijedi elucija metanolom. Ekstrakti se zatim odvajaju i identificiraju HPLC metodom. Navedenom metodom su Siger i suradnici (2008) uspjeli izolirati 256,6 mg kg⁻¹ ukupnih fenolnih spojeva.

Na kromatogramu ekstrakta polifenola sirovoga repičinoga ulja (Slika 5a) se može vidjeti da je prisutan samo jedan pik koji odgovara kanololu dok je kod kromatograma ekstrakta polifenola jestivoga repičinoga ulja prisutan jedan veći pik koji odgovara fenilindanu te četiri

vrlo mala pika. Udio kanolola u ekstraktu sirovoga repičinoga ulja iznosi više od 97%, dok je fenilindan u ekstraktu jestivoga repičinoga ulja prisutan u udjelu većem od 88%. Na temelju dobivenih kromatograma se može zaključiti da su kanolol i fenilindan uspješno izolirani, te da su proizvedeni ekstrakti zadovoljavajuće čistoće i kao takvi se mogu koristiti u daljnjim istraživanjima.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenoga istraživanja te dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Za izolaciju kanolola se može koristiti sirovo repičino ulje jer sadrži kanolol u koncentraciji od 202,35 mg kg⁻¹ ulja (88,02% ukupnih polifenolnih spojeva) dok se za izolaciju fenilindana može koristiti jestivo repičino ulje jer sadrži fenilindan u koncentraciji od 16,62 mg kg⁻¹ ulja (39,65% ukupnih polifenolnih spojeva).
2. Procesom izolacije se uspješno uspjelo izolirati 26,57 mg kanolola uz iskorištenje procesa izolacije i pročišćavanja 52,55% te 6,43 mg fenilindana uz iskorištenje 56,15%.
3. Dobiveni ekstrakti visokog su stupnja čistoće (> 97% kanolola u ekstraktu sirovog i > 88% fenilindana u ekstraktu jestivoga ulja) te mogu koristiti za daljnja istraživanja.

7. LITERATURA

Aherne, F., Kennelly, J.J. (1985) Oilseed meals for livestock feeding. U: Recent developments in pig nutrition, (Cole, D.J.A., Haresign, W., ured.), Butterworths, London, str. 278-315.

Amarowicz, R., Kramac, M., Rudnicka, B., Ciska, E. (1995) TLC separation of glucopyranosyl sinapate and other phenolic compounds. *Fett Wiss. Technol.* **97**, 330-333.

Anonymus (2016) Rapeseed <https://en.wikipedia.org/wiki/Rapeseed#/media/File:Brassica_napus-K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-169.jpg>. Pristupljeno 14.7.2016.

Bagchi, K., Puri, S. (1998) Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr. Health J.* **4**, 350-360.

Bate-Smith, E., Ribereau-Gayon, P. (1959) Leucoanthocyanins in seeds. *Qual. Plant. Mater. Veg.* **5**, 189-198.

Bouchereau, A., Hamelin, J., Lamour, I., Renard, M., Larher, F. (1991) Distribution of sinapine and related compounds in seeds of *Brassica* and allied genera. *Phytochemistry* **43**, 547-557.

Cao, X., Tsukamoto, T., Seki, T., Tanaka, H., Morimura, S., Cao, L., Mizoshita, T., Ban, H., Toyoda, T., Maeda, H., Tatematsu, M. (2008) 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *Int. J. Cancer* **122**, 1445-1454.

Chen, Y., Thiyam-Hollander, U., Barthet, V.J., Aachary, A.A. (2014) Value-Added Potential of Expeller-Pressed Canola Oil Refining: Characterization of Sinapic Acid Derivatives and Tocopherols from Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9800-9807.

Durkee, A. (1971) The nature of tannins in rapeseeds (*Brassica campestris*). *Phytochemistry* **10**, 1583-1585.

Fenton, T., Leung, J., Clandinin, D. (1980) Phenolic components of rapeseed meal. *J. Food Sci.* **45**, 1702-1705.

Gadžo, D., Đikić, M., Mijić, A. (2011) Industrijsko bilje, Štamparija Fojnica, Sarajevo.

Harbaum-Piayda, B., Oehlke, K., Sönnichsen, F., Zacchi, P., Eggers, R., Schwarz, K. (2010) New polyphenolic compounds in commercial deodistillate and rapeseed oils. *Food Chem.* **123**, 607-615.

Hardman, W.E. (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutr. Res. Pract.* **8**, 233-240.

International olive council (2009) Determination of Biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29.

Karačić, V., Šerman, V., Dumanovski, F., Mikulec, Ž., Mas, N., Mitak, M. (2002) Utjecaj repičine sačme na proizvodna svojstva pilića u tovu. *Krmiva* **44**, 179-190.

Koski, A., Pekkerinen, S., Hopia, A., Wähälä, K., Heinonen, M. (2003) Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 110-114.

Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Hopia, A., Kefalas, P., Wähälä, K., Heinonen, M. (2002) Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 294-298.

Kozłowska, H., Naczek, M., Shahidi, F., Zadernowski, R. (1991) Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. U: *Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology* (Shahidi, F., ured.), AVI Book, New York, str. 193-210.

Kozumplik, V., Martinić-Jerčić, Z. (2000) Oplemenjivanje ratarskog i povrtnog bilja u Hrvatskoj. *Agric. Conspec.s Sci.* **65**, 129-141.

Kraljević, D., Šumanovac, L., Duvnjak, V., Plaščak, I. (2008) Wheat and barley yield affected by the rotation of oilseed rape as the preceding crop. *Cereal Res. Commun.* **36**, 1511-1514.

Kraljić, K., Škevin, D., Barišić, L., Kovačević, M., Obranović, M., Jurčević, I. (2015) Changes in 4-vinylsyringol and other phenolics during rapeseed oil refining. *Food Chem.* **187**, 236-242.

Krygier, K., Sosulski, F., Hogge, L. (1982) Free, esterified and insoluble phenolic acids. 2. Composition of phenolic flour and hulls. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 334-336.

- Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, Z., Maeda, H. (2004) Antioxidative and Antimutagenic Activities of 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (Canolol) Isolated from Canola Oil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4380-4387.
- Larsen, L., Olsen, O., Ploeger, A., Sorenson, H. (1983) Phenolic choline esters in rapeseed: possible factors affecting nutritive value and quality. U: Proceedings 6th International Rapeseed Congress, Pariz, str. 1577-1582.
- Leung, J., Fenton, T., Mueller, M., Clandinin, D. (1979) Condensed tannins of rapeseed meal. *J. Food Sci.* **44**, 1313-1316.
- Marjanović-Jaromela, A., Terzić, S., Zorić, M., Marinković, R., Atlagić, J., Mitrović, P., Milovac, Ž. (2011) Ocena stabilnosti prinosa semena i ulja NS sorti uljane repice (*Brassica napus* L.). *Ratar. Povrt.* **48**, 67-76.
- Mc Cord, J.M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652-659.
- Mitaru, B., Blair, R., Bell, J., Reichert, R. (1982) Tannin and fibre contents of rapeseed and canola hulls. *Can. J. Anim. Sci.* **62**, 661-663.
- Naczka, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F. (1997) Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* **62**, 489-502.
- Naczka, M., Nichols, R., Pink, D., Sosulski, F. (1994) Condensed tannins in canola hulls. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2196-2200.
- Naczka, M., Wanasundara, P., Shahidi, F. (1992) Facile spectroscopic determination of sinapine acid in Brassica seeds. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 444-448.
- Nowak, H., Kujawa, K., Zadernowski, R., Rocznik, B., Kozłowska, H. (1992) Antioxidative and antibacterial properties of phenolic compounds in rapeseeds. *Fett Wiss. Technol.* **71**, 149-152.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270-278.
- Rao, A.L., Bharani, M., Pallavi, V. (2006) Role of antioxidants and free radicals in health and disease. *Adv. Pharmacol. Toxicol.* **7**, 29-38.

- Rastija, V., Medić-Šarić, M. (2009) Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem. Ind.* **58**, 121-128.
- Schulz, J., Hermann, K. (1980) Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. II. Determination by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **195**, 95-104.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2010) Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 4067-4079.
- Shahidi, F., Naczk, M. (1992) An Overview of phenolics of canola and rapeseed: Chemical sensory and nutritional significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 917-924.
- Siger, A., Kaczmarek, A., Rudzińska, M. (2015) Antioxidant activity and phytochemical content of cold-pressed rapeseed oil obtained from roasted seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **117**, 1225-1237.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E. (2008) The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids* **15**, 137-149.
- Spielmeyer, A., Wagner, A., Jahries, G. (2009) Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chem.* **112**, 994-948.
- Straková, E., Šerman, V., Suchý, P., Mas, N., Večerek, V. (2008) Razlike u sadržaju hranjivih tvari u različitim sortama uljane repice. *Krmiva* **50**, 215-224.
- Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., Szlyk, E. (2010) Determination of antioxidant capacity and phenolic acids in rapeseed varieties. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7502–7509.
- Tantawy, B., Robin, J., Tollier, M. (1983) Characterisation de deux glycosides acyles du kaempferol dans les extraits ethanologique du toureau de colza 'o-thio'. U: Proceedings 6th International Rapeseed Congress, Pariz, str. 1313-1320.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* **2**, 1231-1246.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hämäläinen, M., Galkin, A., Laitinen, L., Salminen, J., Moilanen, E., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., Heinonen, M. (2005) Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pice bark phenolics for health related effects. *J. Agric Food Chem.* **53**, 5922-5931.

Vuorela, S., Meyer, A., Heinonen, M. (2003) Quantitative analysis of main phenolics in rapeseed meal and differently processed oils using enzymatic hydrolysis and HPLC. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 517-523.

Wakamatsu, D., Morimura, S., Sawa, T., Kida, K., Nakai, C., Maeda, H. (2005) Isolation, identification, and structure of a potent alkyl-peroxyl radical scavenger in crude canola oil, Canolol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1568-1574.

Young, I.S., Woodside, J.V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* **54**, 176-186.

Zacchi, P., Eggers, R. (2008) High-temperature pre-conditioning of rapeseed: A polyphenol-enriched oil and the effect of refining. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **110**, 111-119.