Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

Španić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:578915

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016. Ivana Špranić

720/N

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA MASLINE PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane" (IP-PE-FF) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća te Laboratoriju za procese sušenja i praćenje aktivnosti biološki aktivnih spojeva Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz mentorstvo doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć dr. sc. Predraga Putnika, stručnog suradnika.

ZAHVALA

Zahvaljujem svima koji su svojim prijedlozima, savjetima i podrškom pridonjeli izradi ovog rada. Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na strpljenju, pomoći, vodstvu i izuzetnoj suradnji tijekom izrade rada. Zahvaljujem joj od srca na brojnim pruženim kako znanstvenim i stručnim tako i prijateljskim savjetima, na velikom razumijevanju i podršci te pristupačnosti i izdvojenom vremenu.

Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili tu, uz mene, bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.

Velika HVALA svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA MASLINE PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Ivana Špranić, 720/N

Sažetak: *Listovi masline smatraju se jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visokovrijednih bioaktivnih spojeva, s potencijalnom primjenom u medicini, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta), temperature ekstrakcije (60 °C, 80 °C i 100 °C) kao i broja ciklusa ekstrakcije (1 ili 2 ciklusa) uz 50 % vodenu otopinu etanola (v/v). U ekstraktima lista masline provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola (UF), ukupnih flavonoida (FL), ukupnih flavonola (FLA) te hidroksicimetnih kiselina (HCK) primjenom spektrofotometrijskih metoda. Na temelju dobivenih rezultata statističkom analizom određeni su optimalni parametri ASE ekstrakcije pri kojima se postižu najveći prinosi: (i) UF-80 °C,5 min,2 ciklusa; (ii) FL-80 °C,5 min,1 ciklus; (iii) FLA-100 °C,15 min,2 ciklusa;(iv) HCK-100 °C,15 min,2 ciklusa.*

Ključne riječi: list masline, ASE, ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli

Rad sadrži: 52 stranice, 13 slika, 6 tablica, 91 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. *Danijela Bursać Kovačević*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Predrag Putnik, stručni suradnik*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*
3. Prof. dr. sc. *Branka Levaj*
4. Izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino* (zamjena)

Datum obrane: 28, rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE) OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM OLIVE LEAVES

Ivana Špranić, 720/N

Abstract: *Olive leaves are considered as a cheap raw material which can be used as a valuable source of valuable bioactive compounds, with potential application in medicine, food and pharmaceutical industries. The aim of this study was to investigate the extraction of phenolic compounds from olive leaf by using accelerated solvent extraction (ASE). The effect of various parameters was studied: static extraction time (5, 10, 15 minutes), extraction temperature (60 °C, 80 °C and 100 °C) and number of extraction cycles (1 or 2 cycles). Extraction solvent was 50 % aqueous ethanol (v/v). The content of total phenolics (TPC), total flavonoids (FL), total flavonols (FLA) and total hydroxycinnamic acid (HCA) were spectrofotometrically determined in olive leaf extracts using. All data were statistically analysed and obtained results indicated that the optimal extraction parameters for extraxtion of polyphenols from olive leaves by using ASE were as follows:(i) TPC-80 °C,5 min,2 cycles; (ii) FL-80 °C,5 min,1 cycle ; (iii) FLA-100 °C,15 min,2 cycles;(iv) HCK-100 °C,15 min,2 cycles.*

Keywords: *olive leaf, ASE, total phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, flavonols*

Thesis contains: 52 pages, 13 figures, 6 tables, 91 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD Predrag Putnik, Expert assistant*

Reviewers:
1. PhD *Verica Dragović-Uzelac,* Full professor
2. PhD *Danijela Bursać Kovačević,* Assistant professor
3. PhD *Branka Levaj,* Full Professor
4. PhD *Sandra Balbino,* Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 28 September 2016

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 2

2.1. Maslina (*Olea europea* L.) ... 2

2.2. Kemijski sastav lista masline ... 4

2.3. Fenolni spojevi ... 5

2.3.1. Kemijska struktura i svojstva fenolnih spojeva ... 5

2.3.2. Fenolni spojevi lista masline ... 7

2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline ... 10

2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) ... 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 17

3.1. Materijali ... 17

3.1.1. Uzorak lista masline sorte *Oblica* ... 17

3.1.2. Otapala i reagensi ... 17

3.1.3. Aparatura i pribor ... 19

3.2. Metode rada ... 20

3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE) ... 20

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola ... 21

3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida ... 23

3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola ... 26

3.2.5. Statistička analiza ... 29

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 30

4.1. Određivanje ukupnih fenola ... 31

4.2. Određivanje ukupnih flavonoida ... 34

4.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola ... 37

5. ZAKLJUČCI ... 42

6. LITERATURA ... 44

1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzelena biljka iz porodice *Oleaceae*, vrlo je važna poljoprivredna kultura koja se uzgaja širom svijeta, dok 98 % svjetskog usjeva raste na području mediteranskih zemalja. Listovi masline su nusproizvod u kultivaciji maslina te u proizvodnji maslinovog ulja, a smatraju se jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visoko vrijednih spojeva poput određenih skupina fenola.

Korištenje maslinovih listova poznato je stoljećima pa su tako na mediteranskom području korišteni u narodnoj medicini za liječenje groznice i malarije kao i za procese konzerviranja hrane. Ljekovitost maslinovog ulja i listova dokazana je mnogim istraživanjima, a zdravstveni učinak se ostvaruje brojnim biološki aktivnim spojevima. Razne studije su potvrdile kako listovi masline imaju antioksidacijsko, hipoglikemijsko, antihipertenzivno, antimikrobno te antiaterosklerotsko djelovanje.

S obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva s različitom strukturom i svojstvima, danas postoji velik broj ekstrakcijskih metoda koje se koriste za izolaciju polifenola iz lista masline. Jedna od novijih tehnika je ubrzana ekstrakcija otapalima (Accelerated Solvent Extraction, ASE) s brojnim prednostima pred konvencionalnom tehnikom ekstrakcije poput mogućnosti primjene otapala koja ne zagađuju okoliš, kao i upotreba manje količine otapala za veći ekstrakcijski prinos. Ova se tehnika smatra ekološki prihvatljivom metodom koja kombinacijom visoke temperature i tlaka s tekućim otapalima omogućuje brzo i učinkovito ekstrahiranje bioaktivnih spojeva. U usporedbi s ostalim tehnikama ekstrakcije, posebnost ove ekstrakcije ogleda se u mogućnosti visokog stupnja automatizacije te provedbu ekstrakcije u ciklusima, čime se značajno štedi utrošak otapala, vremena i energije, a istovremeno povećava iskorištenje ekstrakcije.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta), temperature ekstrakcije (60 °C, 80 °C i 100 °C) kao i broja ciklusa ekstrakcije (1 ili 2 ciklusa) uz 50 % vodenu otopinu etanola. U pripremljenim ekstraktima određeni su maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina te su na temelju dobivenih rezultata određeni optimalni parametri ASE ekstrakcije pri kojima se postižu najveći prinosi svih određivanih skupina fenolnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLINA (*Olea europea* L.)

Maslina (*Olea europaea* L.) (Slika 1.) je zimzelena biljka iz porodice *Oleaceae* koja se uzgaja u mnogim dijelovima svijeta, a prvenstveno na području Mediterana (Vogel i sur., 2015). Dugovječna je, pa njena stabla mogu doživjeti i više stotina godina (Benčić i sur., 2011). Raste na oskudnom tlu, gotovo bez vode, ali uz obilje sunca. Zbog visokog postotka ulja u plodovima (15-35 %), maslina je dobila ime po latinskoj riječi *olea*, što znači ulje. Smatra se jednom od najstarijih kultura poznata je već između 5 000 i 7 000 godina, a porijeklom je s Krete (Therios, 2008).

Maslina (uljika, ulika) spada u red *Oleales*, porodicu *Oleaceae*, podporodicu *Oleoideae* i rod *Olea*. Neki od značajnijih i poznatijih rodova koji također pripadaju porodici *Oleaceae* su *Fraxinus* (jasen), *Forsythia* (forzicija), *Ligustrum* (kalina) i *Syringa* (jorgovan) (Therios, 2008).

Rod *Olea* obuhvaća najmanje 30-35 vrsta, a vrsta *O. europaea* uključuje mnoge grupe i više od 2 600 kultivara, od kojih su mnogi ekotipovi. Divlja maslina *O. oleaster* i kultivirana maslina *O.sativa* su glavne vrste maslina na području Mediterana (Therios, 2008).

Maslina je vrlo važna poljoprivredna kultura, širom svijeta uzgaja se na području od oko 8 milijuna hektara, dok 98 % svjetskog usjeva raste u mediternskim zemljama (Abaza i sur., 2015). Glavni proizvod dobiven iz stabla masline je maslinovo ulje, kojeg se godišnje proizvede oko 11 milijuna tona (Vogel i sur., 2015).



Slika 1. Maslina (*Olea europea* L.) (Anonymous 1, 2015)

Maslinarstvo ima dugu tradiciju i u Hrvatskoj. Prema dostupnim podacima, u 2009. godini u Hrvatskoj je proizvedeno 32 592 t ploda od čega je dobiveno 4 917 t maslinovog ulja. U priobalnom području Hrvatske maslina je najraširenija voćna kultura, a Dalmacija danas broji oko 3,5 milijuna stabala masline. U uzgoju je prisutan veliki broj kultivara, a najbrojniju i gospodarski najvrjedniju sortu masline predstavlja Oblica koja se uzgaja na cijelom uzgojnom području masline u Hrvatskoj već više od 2000 godina (Strikić, 2015).

Oblica se smatra autohtonim kultivarom. Sadržaj ulja u plodu varira od 18-21 %, ovisno o uzgojnom području i uvjetima uzgoja. Osim krupnog ploda, sorta ima visoku toleranciju na sušu, dobro uspijeva na siromašnim i škrtim tlima te podnosi jače udare vjetra. List je srednje krupan, dug i širok, eliptičnog oblika s valovitom površinom, sivomaslinaste boje lica. Masa ploda varira od 2,5 do 14,5 grama, uz prosječnu masu oko 5 grama. Zbog krupnoće, sorta se koristi za zeleno i crno konzerviranje te prerađuje u ulje. Veoma je adaptabilna sorta i može se uzgajati na različitim položajima, nagibima i nadmorskim visinama (Strikić, 2015).

Osim ploda, list masline također ima značajnu vrijednost te se u posljednje vrijeme sve više istražuje njegov biološki potencijal. Listovi masline, u prosjeku dugački 5-8 cm, ovalno kopljastog oblika, cjeloviti i kožasti na izboju su smješteni nasuprotno. Mladi listovi imaju ‘živu’ zelenu boju, a starenjem poprimaju zagasitu zelenu - maslinastu boju zbog prisutnosti tanina. Ovisno o sorti, naličje listova može biti manje ili više srebrnasto, što može imati krajobraznu i ukrasnu vrijednost. Listovi, u prosjeku, traju oko tri godine (Therios, 2008).

Na mediteranskom području listovi masline su nusproizvod u kultivaciji maslina te u proizvodnji maslinovog ulja (Abaza i sur., 2015). Termin „listovi masline“ odnosi se na mješavinu listova i grančica maslina dobivenih tijekom procesa orezivanja, berbe i čišćenja maslina (El i sur., 2009). Dostupni su tijekom čitave godine, a značajne količne se nakupljaju tijekom perioda orezivanja kada od jednog stabla može nastati i do 25 kg nusprodukta te tijekom berbe kada se dobije 5 % nuspodukta od ukupne ubrane količine (Abaza i sur., 2015; Salah i sur., 2012).

Listovi masline smatraju se jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visoko vrijednih spojeva poput fenolnih spojeva i upravno zbog toga u posljednjih nekoliko godina dolazi do porasta interesa za istraživanjem lista masline (Salah i sur., 2012). Ekstrakti lista masline sve više se koriste u medicini, prehrambenoj industriji za produljenje trajnosti hrane te u razvoju funkcionalnih proizvoda, osim toga koriste se u razvoju kozmetičkih proizvoda i

farmaceutika. Listovi masline mješaju se sa prezrelim maslinama tijekom proizvodnje ulja kako bi se dobilo ulje boljeg okusa (Talhaoui i sur., 2014) ili se ekstrakt maslinovog lista direktno dodaje u jestiva ulja poput maslinovog ulja, suncokretovog ulja ili palminog ulja čime se poboljšava antioksidacijski kapacitet i stabilnost ulja (Salta i sur., 2007).

2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA MASLINE

Kemijski sastav lista masline varira ovisno o podrijetlu, udjelu grančica, uvjetima skladištenja, klimatskim uvjetima, sadržaju vlage i stupnju onečišćenja te ovisno o primjenjenim procesima prerade, tj. procesima sušenja i ekstrakciji (Rahmanian i sur., 2015; El i sur., 2009).

List masline tvore lignocelulozne biomase koje se sastoje od celuloze, hemiceluloze i lignina (Romero-García i sur., 2016). Najveći udio hemiceluloznih vlakana čine vlakna arabinoznog tipa, dok je u grančicama pretežito zastupljena manoza (Vogel i sur., 2015). U listu masline također su pronađeni drugi ugljikohidrati, ulja, sirovi proteini, vlakna, anorganski spojevi te niz sekundarnih biljnih metabolita (Skaltsounis i sur., 2015). Sadržaj sirovih proteina varira između 9,5 i 12,9 %. A najzastupljenije aminokiseline su arginin, leucin, prolin, glicin, valin i alanin (Vogel i sur., 2015). Od šećera, u listu su pronađeni glukoza i šećerni alkoholi od kojih je najvažniji manitol, čiji sadržaj se povećava sa 160 na 220 μmol/g suhe tvari u uvjetima povećane suše i saliniteta. Manitol predstavlja 70 % topljivih ugljikohidrata u listu masline čija je razina više manje konstantna tijekom cijele godine (Therios, 2008). Od mineralnih tvari u listu masline prisutni su kalcij, kalij, magnezij, fosfor, sumpor i silicij (Alcázar Román i sur., 2014). Esencijalna ulja lista masline imaju antioksidacijski kapacitet dva puta veći od ekstrakta zelenog čaja i 400 % veći od vitamina C. Ulje lista masline složena je smjesa aldehida, ketona, estera, alkohola, alkena i alkana (Rahmanian i sur., 2015).

Također, u listu masline pored različitih fenolnih spojeva, koji značajno doprinose biološkoj vrijednosti ove sirovine, prisutni su i drugi brojni nefenolni sastojci uključujući pentacikličke triterpene i hidroksi terpenske kiseline (α i ß-amirin, maslinska kiselina i oleanolna kiselina), palmitinsku kiselinu, skvalene, sterole, α-tokoferol i beta-karoten. Alkoholi, voskovi i triacilgliceroli su također prisutni u listu masline (Skaltsounis i sur., 2015). Glavni triterpeni prisutni u listu masline su oleanolna kiselina i to u količini od 3,0-3,5

% suhe tvari i maslinska kiselina, a u manjim količinama je zastupljena ursolna kiselina (Guinda i sur., 2015). Eritrodiol i uvaol, prekursori triterpenskih kiselina, također su prisutni u listu masline sa sadržajem uvaola većim od sadržaja eritrodiola (Skaltsounis i sur., 2015). Oleanolna kiselina izolirana iz biljnog materijala inhibira proliferaciju tumorskih stanica, inducira apoptozu, sprječava angiogenezu kao i invaziju i metastaziranje tumorskih stanica (Guinda i sur., 2015).

2.3. FENOLNI SPOJEVI

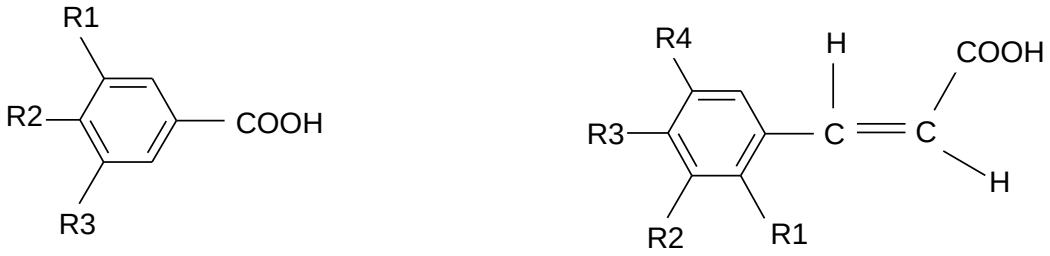
2.3.1. Kemijska struktura i svojstva fenolnih spojeva

Fenolni spojevi ili polifenoli, najvažnija su grupa sekundarnih biljnih metabolita koji imaju vrlo važnu fiziološku i morfološku ulogu u rastu i reprodukciji biljke, zaštiti protiv patogena i predatora (Bravo, 1998) te pridonose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća (Alasalvar i sur., 2001). Sintetiziraju ih biljke tijekom normalnog razvoja kao odgovor na stresne uvjete kao što su infekcije, oštećenja i UV zračenje. Ti spojevi nastaju u svim dijelovima biljke i predstavljaju vrlo raznoliku skupinu bioaktivnih spojeva nastalih iz fenilalanina i tirozina.

Postoji više od 8000 različitih vrsta polifenolnih spojeva koji su široko rasprostranjeni u ljudskoj prehrani. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, uglavnom su u esterificiranom ili konjugiranom obliku tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine. Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida, a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Polifenoli se mogu konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).

Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo, 1998). Prema kemijskoj strukturi, fenolni spojevi u biljkama dijele se na: (i) flavonoide, (ii) fenolne kiseline, (iii) kumarine, (iv) stilbene, (v) hidrolizirane i kondenzirane tanine (Shadidi i Naczk, 2004). Svaka skupina je dodatno podijeljena u podskupine na temelju razlika u kemijskoj strukturi (Erdman i sur., 2007).

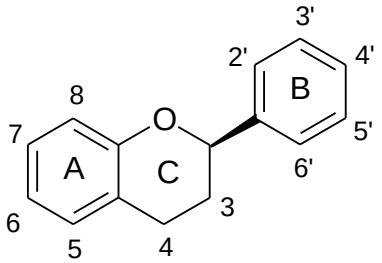
Fenolne kiseline u biljnom tkivu uglavnom su prisutne kao derivati, a dijele se u dvije osnovne skupine: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Razlike u strukturi između pojedinačnih hidroksicimetnih ili hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Belitz i sur., 2004) (Slika 2).



(a) **(b)**

Slika 2. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (a) i hidroksicimetnih kiselina (b) (Belitz i sur., 2004)

Flavonoidi su spojevi koji imaju osnovnu flavansku strukturu (Slika 3), koju tvori difenilpropanski kostur C15 (C6-C3-C6) građen od dva benzenska prstena A i B povezana piranskim prstenom C koji sadrži kisik. Do danas je identificirano preko 4000 različitih flavonoida (Heim i sur., 2002), a dijele se na: antocijane, flavonole, flavanole, flavone, flavanone, izoflavone, procijanidine i dr. (Hollman i Katan, 1999).



Slika 3. Kemijska struktura flavonoida (Belitz i sur., 2004)

Polifenoli su česti sastojci hrane biljnog podrijetla i glavni antioksidansi u našoj prehrani. Dnevno se prehranom unese oko 1 g polifenola, što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa (Scalbert i sur., 2005). Pozitivna djelovanja polifenola navedena u

znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihipertenzivno, antiaritmično, spazmolitičko, antikoagulirajuće, kardiotonično, antialergijsko, analgetsko, antihepatotoksično, antimalarično, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Manach i sur., 2005; Middleton i sur., 2000).

Antioksidacijsko djelovanje polifenola povezuje se s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i postojanje više rezonantnih oblika, dok hidroksilne skupine imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

2.3.2. Fenolni spojevi lista masline

Na razini primarnih i sekundarnih biljnih metabolita, list je primarno mjesto biljnog metabolizma te se smatra potencijalnim izvorom biološki aktivnih komponenti. Fenolni spojevi prisutni u listu masline su brojni i različite prirode (Abaza i sur., 2015), stoga se list masline smatra jeftinim i lako dostupnim prirodnim izvorom fenolnih komponenti (Piné i sur., 2012). U usporedbi s maslinovim uljem, list masline sadrži veću količinu polifenolnih spojeva, npr. količine oleuropeina u ulju se kreću u rasponu od 0,005-0,12 %, dok je taj raspon u listovima između 1-14 % (Japón-Luján i sur., 2006a).

Određeni udjeli ukupnih polifenola i flavanoida u listu masline iznose 2,058 mg GAE (ekvivalent galne kiseline)/100 g i 858 mg CTE (ekvivalent katehina)/100 g, što odgovara količinama koje se nalaze u pokožici crvenog grožđa (El i sur., 2009).

Listovi masline predstavlju bogat izvor flavonoidnih spojeva, bez obzira na starost lista, berbu listova te sortu masline (Rahmanian i sur., 2015). Glavne fenolne skupine prisutne u listu masline su (Therios, 2008; El i sur., 2009; Abaza i sur., 2015; Vogel i sur., 2015) (Tablica 1). :

- Sekoiridoidi ili oleuropeozidi (oleuropein, verbaskozid, ligstrozid, dimetiloleuropein)
- flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin i diosmetin)
- flavonoli (rutin, kvercetin, kempferol)
- flavan-3-oli (katehin)

- flavanoni (hesperetin)
- supstituirani fenoli (tirosol, hidroksitirosol, vanilin, vanilinska kiselina i kafeinska kiselina)

Tablica 1. Fenolne skupine u ekstraktu lista masline (Olive Leaf Extract , OLE), njihovi primjeri, postotni udjeli i antioksidacijski kapacitet (prilagođeno prema referenci iz Benavente-Garcia i sur., 2000; Rahmanian i sur., 2015)

Fenolne skupine	**Spojevi**	**% sadržaj u OLE**	**TEAC (mmol/L)**
Sekoiridoidi	Oleuropein	24,54	0,88 ± 0,09
	Verbaskozid	11,11	1,02 ± 0,07
Flavoni	Luteolin-7-glukozid	1,38	0,71 ± 0,04
	Apigenin-7-glukozid	1,37	0,42 ± 0,03
	Diosmetin-7-glukozid	0,54	0,64 ± 0,09
	Luteolin	0,21	2,25 ± 0,11
	Diosmetin	0,05	1,42 ± 0,07
Flavonoli	Rutin	0,05	2,75 ± 0,05
Flavan-3-oli	Katehin	0,04	2,28 ± 0,04
Supstituirani fenoli	Tirosol	0,71	0,35 ± 0,05
	Hidroksitirosol	1,46	1,57 ± 0,12
	Vanilin	0,05	0,13 ± 0,01
	Vanilinska kiselina	0,63	0,67 ± 0,09
	Kafeinska kiselina	0,34	1,37 ± 0,08

Najaktivniji i najzastupljeniji spoj u listovima masline sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem je oleuropein (Talhaoui i sur., 2014). U kemijskom smislu, oleuropein je heterozidni ester elenolne kiseline i dihidroksifeniletanola u kojem su zastupljene mono-terpenska i orto-difenolna struktura (Pannizzi i sur., 1960). Hidrolitičkim cijepanjem oleuropeina nastaje elenolna kiselina, za čije kalcijeve soli tzv. kalcijeveelenolate je dokazano izrazito antivirusno djelovanje (Khan i sur., 2007). Svi dijelovi masline sadrže oleuropein, ali

su listovi najbogatiji izvor ovog spoja (60-90 mg/g suhe tvari) (Ansari i sur., 2011), odnosno udio u suhoj tvari može biti i veći od 15 % (Skaltsounis i sur., 2015). Starenjem i zbog enzimske aktivnosti endogene ß-glukozidaze, razina oleuropeina se postepeno smanjuje u listovima masline (Ranalli i sur., 2006).

Osim sekoiridoida, u listu masline zastupljeni su još i supstituirani fenoli među kojima hidroksitirosol i flavon-7-glukozidi (luteolin i apigenin) (El i sur., 2009; Salah i sur., 2012). 3,4-Dihidroksifenil etanol poznatiji kao hidroksitirosol, glavni je razgradni produkt, odnosno prekursor oleuropeina, a verbaskozid je konjugirani glukozid hidroksitirosola i kafeinske kiseline (El i sur., 2009; Vogel i sur., 2015). U neprerađenim maslinama i listovima masline pronađene su veće koncentracije oleuropeina, dok je hidroksitirosol zastupljeniji u prerađenim maslinama i ulju (El i sur., 2009). Koncetracije ovih spojeva u listovima masline variraju ovisno o sorti masline, uvjetima uzgoja te ovisno o tome koja je metoda ekstrakcije primjenjena, prema dostupnim podacima oleuropein prosječno čini do 14 % suhe tvari lista masline, dok hidroksitirosol čini 0,94-1,12 % suhe tvari (Romero-Garcia i sur., 2016). Pereira i sur. (2007) detektirali su oleuropein u količini od 24,5 % suhe tvari, Guinda i sur. (2015) 14 %, a Talhaoui i sur. (2014) 30,2 %. Pereira i sur. (2007) također su utvrdili da je oleuropein (29 %) najzastupljeniji fenol u sirovom ekstraktu listova masline, a Hayes i sur. (2011) su dokazali da su oleuropein i luteolin-7-O-glukozid najzastupljeniji fenolni spojevi u liofiliziranom ekstraktu maslinova lista.

Listovi masline bogat su izvor flavonoida, neovisno o tipu kultivara, starosti masline ili vremenu berbe, a do sada su u istim pronađene različite forme ovih spojeva (Rahmanian i sur., 2015). Tankoslojnom kromatografijom i snimanjem UV spektra u listu masline su detektirana tri flavonoidna glikozida (kvercetin, rutin i luteolin-7-glikozid), flavonoidni aglikon (luteolin) i klorogenska kiselina (Heimler i sur., 1992). HPLC-DAD analizom u listu masline određeni su sljedeći flavonoidi: luteolin 7,4'-O-diglukosid, luteolin-7-O-glukosid, luteolin-7-O-rutinosid, luteolin 4'-O-glukosid, luteolin, apigenin-7-O-rutinosid, apigenin-7-O-glukosid, diosmetin-7-O-glukosid, rutin, apigenin i diosmetin (Rahmanian i sur., 2015; Skaltsounis i sur., 2015).

Od fenolnih kiselina u listu masline prevladavaju hidroksicimetne kiseline i njeni derivati. Najvažnije hidroksicimetne kiseline pronađene u listu masline su kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska i klorogenska kiselina (Xie i sur., 2015). Najzastupljenija je kafeinska kiselina s udjelom od 2,17 mg/g (Xie i sur., 2015; Pereira i sur., 2007). Mert i sur. (2013) u listu masline identificirali su 4 najzastupljenije hidoksicimetne kiseline: klorogensku (6,94-

41,37 mg/g), kafeinsku (9,62-22,19 mg/g), 3-hidroksicimetnu (5,38-29,89 mg/g) i *p*-kumarinsku (0,26-14,73 mg/g).

Polifenolni spojevi iz lista masline imju veliku sposobnost uklanjanja slobodnih radikala te snažno antioksidacijsko djelovanje, veće i od nekih poznatijih antioksidansa, koje se pripisuje sinergiji između flavonoida, oleuropeozida i supstituiranih fenola. Najveći antioksidacijski kapacitet pripisuje se rutinu, katehinu, luteolinu i hidroksitirosolu (Tablica 1.) (Rahmanian i sur., 2015). Prema rezultatima istraživanja Lee i Lee (2010) potvrđeno je da gotovo svi fenolni spojevi prisutni u ekstraktu lista masline, osim vanilina, bilo kao pojedinačni spojevi ili u kombinaciji, imaju snažnu sposobnost uklanjanja nitratnih radikala. Nadalje, rezultati znanstvenih istraživanja pokazuju da flavonoidi lista masline inhibiraju ili ubijaju mnoge bakterijske sojeve, inhibiraju važne virusne enzime, kao što su povratna transkriptaza i proteaza te uništavaju neke patogene protozoe (Rahmanian i sur., 2015). U istraživanju Vogel i sur. (2015) pokazano je da su oleuropein i verbaskozid, kao glavni predstavnci sekoiridoida prilično rezistentni na želučanu probavu, no da tijekom intestinalne probave dolazi do degradacije ovih spojeva. *In vitro* istraživanja koja stimuliraju uvjete u humanom gastrointestinalnom traktu, dokazala su da je luteolin-7-glukozid najstabilniji fenolni spoj.

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ LISTA MASLINE

Ekstrakcija je jedan od najvažnijih koraka koji prethodi analizi polifenolnih spojeva (Talhaoui i sur., 2015), a predstavlja brzu i učinkovitu metodu razdvajanja i koncentriranja tvari. Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju.

Sve metode ekstrakcije otapalima baziraju se na miješanju uzorka s prikladnim otapalom i/ili prevođenje uzorka u dvofazni sustav sastavljen od dva ili više otapala koja su međusobno slabo topljiva. Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala s obzirom na polarnost, vremenu ekstrakcije, temperaturi te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Dai i Mumper, 2010).

Metode ekstrakcije koje se koriste za ekstrakciju polifenolnih spojeva međusobno se razlikuju s obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva s različitom

strukturom i svojstvima, koje se želi izolirati. Ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih polifenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju (Valls i sur., 2009).

U idealnom slučaju postupak ekstrakcije trebao bi biti jednostavan, brz, jeftin, trebao bi dati kvantitativne analitičke rezultate bez gubitaka ili razgradnje analita i trebao bi dati otopinu analita koja je dovoljno koncentrirana da se može izravno mjeriti bez potrebe za koncentriranjem.

Postoji velik broj ekstrakcijskih metoda koje se koriste kako bi se odredio polifenolni sastav lista masline. Izbor metode ekstrakcije ovisi o strukturi, molekularnim masama, polarnosti, topljivosti, pK-vrijednostima i drugim svojstvima komponenti koje želimo izolirati ili razdvojiti. Najčešće korištena ekstrakcijska tehnika za list masline je ekstrakcija kruto-tekuće koja se izvodi kao maceracija, međutim glavni nedostatak ove tehnike je dugotrajnost (∼48 h) (Rahmanian i sur., 2014). Najčešće korištena otapala za izolaciju polifenolnih spojeva iz lista masline su list masline su metanol, etanol, aceton, etil acetat i dietil eter te vodene otopine alkohola, a upravo pravilan odabir otapala značajno utječe na iskorištenje ekstrakcije polifenola (Talhaoui i sur., 2015).

Općenito, fenolni spojevi topljiviji su u polarnim otapalima kao što su alkoholi (etanol ili metanol), dok su galna, cimetna i kumarinska kiselina topljivije u vodi, diklormetanu i acetonu (Rahmanian i sur., 2014). Sadržaj ukupnih flavonoida i fenola bio je značajno veći korištenjem otapala kao što su etanol, butanol i etil acetat nego kada su korišteni heksan, kloroform i voda (Lee i sur., 2009). Etil acetat se smatra najselektivnijim otapalom za ekstrakcije fenolnih spojeve male (oko 180 Da) i srednje (oko 13 kDa) molekulske mase (Bouaziz i sur., 2008). Glicerol se također koristi za ekstrakcije bioaktivnih sastojaka iz lista masline (Apostolakis i sur., 2014).

Neka istraživanja navode kako vodena otapala osiguravaju bolju ekstrakciju fenolnih frakcija zbog toga što voda povećava difuziju polifenola kroz biljno tkivo (Galanakis i sur., 2010). Pereira i sur. (2007) su detektirali veće količine polifenolnih sastojaka u vodenom estraktu, nego u metanolnom ekstraktu istih ili različitih sorti lista masline. Glavni spojevi u oba ekstrakta su bili flavonoidi. U vodenom ekstraktu oleuropein je činio čak ~73 % od ukupno svih identificiranih spojeva, a najmanje zastupljena komponenta bila je kafeinska kiselina s udjelom od ~1 % ukupnih polifenola.

Kao glavni nedostatak konvencionalnih ekstrakcijskih tehnika navodi se njihova niska učinkovitost, dugotrajan proces ekstrakcije i upotreba velikih količina organskih otapala što ima negativne posljedice na okoliš (Taamalli i sur., 2012). Stoga se sve više ispituju i primjenjuju nove teknike ekstrakcija kao što su: ubrzana ekstrakcija otapalima (eng. accelerated solvent extraction, ASE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. microwave-assistend extraction, MAE), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (eng. high pressure assisted extraction, HPAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. ultrasound assisted extraction, UAE), ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim elektirčnim pražnjenjem (engl. high voltage electrical discharge, HVED) i ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. supercritical fluid extraction, SFE) (Bursać i sur., 2016; Putnik i sur., 2016; Nayak i sur., 2015).

2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

Ubrzana ekstrakcija otapalom (eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE) je automatizirana tehnika ekstrakcije koja kombinacijom visoke temperature i tlaka s tekućim otapalima omogućuje brzo i učinkovito ekstrahiranje bioaktivnih spojeva (Jentzer i sur., 2015). Ubrzana ekstrakcija otapalom poznata je pod nazivima i kao ekstrakcija pod tlakom, ekstrakcija s otapalom pod tlakom te poboljšana ekstrakcija otapalom (Mustafa i Turner, 2011). Ova moderna metoda ekstrakcije predstavljena je od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995 godine, a primjenjuje se za izolaciju širokog spektra bioaktivnih spojeva, a naročito je pogodna za ekstrakciju spojeva osjetljivih na povišenu koncentraciju kisika i termolabilnih spojeva. U usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku omogućuje visok stupanj automatizacije, veće prinose ekstrakcije i kraće trajanje cijelog procesa (Jentzer i sur., 2015).



Slika 4. Sustav za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (Dionex ASE 350) (Yang i sur., 2014)

ASE radi na temperaturama višim od vrelišta većine otapala (25-125 °C) i koristi visoki tlak (6,9-13,8 MPa) koji zadržava otapalo u tekućem stanju pri visokim temperaturama tijekom procesa ekstrakcije. Sam proces ekstrakcije je vrlo brz (5-25 min) pri čemu se troše male količine otapala, ovisno o ekstrakcijskim parametrima to može iznositi samo 15-45 mL ekstrakcijskog otapala (Mottaleb i Sarker, 2012). Uporaba otapala smanjuje se i do 90 %, što znači nižu cijenu cjelog postupka te manje izlaganje analitičara potencijalno toksičnim parama.

Visoka temperatura povećava topljivost analita, brzinu difuzije, smanjuje viskoznost otapala što omogućava otapalu da dublje prodire u tkivo uzorka, pospješujući ekstrakciju analita iz pora tkiva. Također, visoka temperatura oslabljuje međumolekulske interakcije kao što su van der Waalsove sile, vodikove sile i dipol-dipol veze između otopljenog analita i matriksa (Saha i sur., 2015).

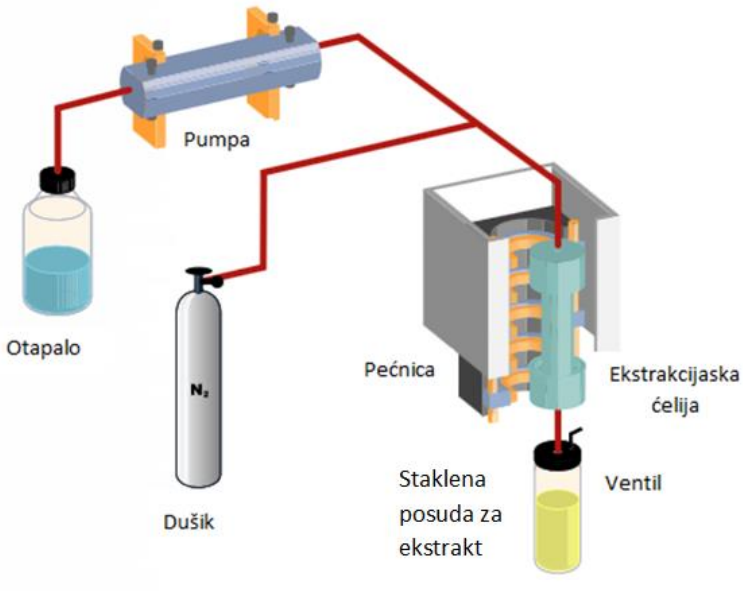
Prednost ove ekstrakcijske tehnike ogleda se i u mogućnosti provođenja ekstrakcije u više stupnjeva (ili ciklusa) uz isto statičko vrijeme ekstrakcije, čime se značajno povećava učinkovitost izolacije željenih komponenata (Mottaleb i Sarker, 2012). Ekstrakcija se vrši uz upotrebu različitih vrsta mono otapala ili smjese različitih vrsta otapala (najčešće se koriste binarni sustavi), a sam uređaj ima mogućnost provođenja ekstrakcije uz doziranje tri različite vrste otapala (Mottaleb i Sarker, 2012). Nadalje, ekstrakcija se iz istog uzorka može provoditi neograničen broj puta, do potpune ekstrakcije željenog spoja, samo s jednim ili sva tri ekstrakcijaska otapala.

Aparatura za ekstrakciju (Slika 5.) se sastoji od: (i) ekstrakcijske ćelije koja ima automatski sustav zatvaranja da bi mogla izdržati povišeni radni tlak; (ii) pumpe koja služi za ostvarivanje radnog tlaka i transport ekstrakcijskih otapala; (iii) pećnice koja zagrijava uzorak; (iv) tekućeg dušika koji suši ekstrahirani analit po završetku ekstrakcije; i (v) staklene posude za prihvat ekstrakata.

U ekstrakcijske ćelije različitog volumena (1, 5, 10, 22, 34, 66, i 100 mL) od nehrđajućeg čelika, koje podnose visoke radne temperature prvo se stavlja odgovarajući filter (stakleni ili celulozni, ovisno o ekstrakcijskom otapalu). Nakon filtera, u ekstrakcijsku ćeliju postavlja se adsorbens, jer miješanje uzorka s pijeskom ili dijatomejskom zemljom spriječava agregaciju čestica uzoraka, što bi inače dovelo do začepljenja ekstrakcijske ćelije. Zatim se u ekstrakcijsku ćeliju uvodi uzorak koji prethodno mora biti odgovarajuće pripremljen. Učinkovita ekstrakcija zahtijeva čestice manje od 1 mm, jer što je veća površina čestice, to će ekstrakcija biti brža. Za učinkovitu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku svi uzorci ne moraju biti potpuno suhi, već to ovisi o analitu, uzorku i otapalima upotrebljenim za ekstrakciju. Visoke razine vode u uzorku spriječavaju nepolarna organska otapala da dođu do analita, međutim upotreba polarnijih otapala kao što su aceton, metanol, ili smjese otapala n-heksan-aceton, diklormetan-aceton ili etilacetat-metanol omogućavaju ekstrakciju iz vlažnih uzoraka (Mottaleb i Sarker, 2012).

Jednom kad je uzorak stavljen u ekstrakcijsku ćeliju cijeli je proces automatiziran i programiran. Ova ekstrakcija omogućuje automatiziranu ekstrakciju maksimalno 24 uzorka (Zaghdoudi i sur., 2015).

Ekstrakcijska ćelija napunjena uzorkom umeće se u rotirajuće utore koji vrte ekstrakcijsku ćeliju do položaja koji omogućuje njen prijenos do pećnice. U pećnici se ćelija puni otapalom, zagrijava i nalazi pod tlakom. Nakon što se u ćeliji postigne zadana temperatura, ćelija se za vrijeme statičke ekstrakcije zadržava u pećnici pod konstantnom temperaturom i tlakom. Uzorak i otapalo sakupljaju se u staklenoj posudi, a ćelija se ispire i suši s dušikom. Nakon završetka ekstrakcije, ćelija se vraća u početnu poziciju i slijedi nova ekstrakcija u ćeliji koja je unaprijed već postavljena na slijedeću poziciju (Anonymous 2, 2015). Obzirom da je nakon ekstrakcije materijal osušen, moguće je vršiti ponovljene ekstrakcije s istim otapalom ili sukcesivne ekstrakcije koristeći otapala s rastućom polarnosti (Mottaleb i Sarker, 2012).



Slika 5. Shematski prikaz procesa ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (prilagođeno prema referenci iz Richter i sur., 1996)

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku koristi konvencionalna otapala, kao i vodu i etanol za izolaciju polarnih do srednje polarnih spojeva zadržavajući time ekološka svojstva ekstrakcije (Mustafa i Turner, 2011). Ova metoda uspješno se primjenjuje za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz različitih uljnih produkata, kao što su listovi i komina (Xynos i sur., 2012).

Taamalli i suradnici (2012) istraživali su koja od tehnika ekstrakcije (ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak, ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ili klasična ekstrakcija kruto-tekuće) ostvaruje najveće prinose polifenolnih spojeva iz različitih sorti lista masline. Rezultati su pokazali da su najveći prinosi polifenolnih spojeva dobiveni ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz povišeni tlak (19,9 %) i klasičnom ekstrakcijom (16,8 %), a najmanji prinosi su dobiveni ekstrakcijom superkritičnim fluidom (9,7 %). Međutim, najveći prinosi nisu bili u korelaciji sa koncentracijama ukupnih fenola pa je ekstrakt dobiven ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima imao najveći sadržaj ukupnih polifenola.

U novije vrijeme kao otapalo za ASE ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lista masline i nusproizvoda pri proizvodnji ulja koristi se i voda. U ovom slučaju dielektrična konstanta vode, mjera je polarnosti, a porastom temperature uslijed povišenog tlaka, konstanta se smanjuje. Time dolazi i do smanjenja polarnosti otapala što može imati utjecaj na polarnost

organskih otapala poput vodenih otopina etanola ili metanola. Različiti uvjeti ASE ekstrakcije su ispitivani, a ekstrakti s najvećim biološkim potencijalom su dobiveni upotrebom vode pri 200 °C i etanola pri 150 °C. Sadržaj polifenolnih spojeva u dobivenim ekstraktima povećava se porastom temperature kada se voda koristi kao ekstrakcijsko otapalo, a glavni fenolni spoj u tako dobivenim ekstaktima je hidroksitirosol (Skaltsounis i sur., 2015). Obrnuto, u ekstraktima dobivenim ovom tehnikom uz primjenu etanola kao ekstrakcijskog otapala oleuropein je najzastupljeniji fenolni spoj (Xynos i sur., 2012). Neka od prijašnjih istraživanja također potvrđuju da su iskorištenja oleuropeina najbolja uz primjenu vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala (Japón-Luján i Luque de Castro, 2006b; Xynos i sur., 2014).

Xynos i sur. (2014) su ASE ekstrakcijom izolirali fenolne spojeve iz lista masline te su utvrdili optimalne parametre ekstrakcije (i) ekstrakcijsko otapalo: vodena otopina etanola (43:57, v/v); (ii) temperatura ekstrakcije od 190 ºC; (iii) broj ciklusa: 1; (iv) statičko vrijeme ekstrakcije: 5 min. Korištenjem ekstrakcije pregrijanom tekućinom (engl. *Superheated liquid extraction*) primjenom vodene otopine etanola kao ekstrakcijskog otapala (70:30, v/v) u vrlo kratkom ekstrakcijskom vremenu (13 min) iz lista masline ekstrahirana je maksimalna količina oleuropeina od 23 g/kg te su također izolirane visoke koncentracije verbaskozida, apigenin-7-O-glukozida i luteolin-7-O-glukozida (Japón-Luján i sur., 2006a). Ovom tehnikom u visokom udjelu također su izolirani spojevi hidroksitirosol, tirosol i verbaskozid iz organskog otpada masline u proizvodnji ulja (Anter i sur., 2014; Japón-Luján i Luque de Castro, 2007; Lozano-Sánchez i sur., 2014; Pérez-Serradilla i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak lista masline sorte *Oblica*

Istraživanje je provedeno na biljnom ekstraktu lista masline sorte *Oblica* (listovi masline su sakupljeni na području RH te osušeni). Biljni preparati lista masline su samljeveni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita CG1, Italy) u prah, a dobiveni prah je korišten za ekstrakcije fenolnih spojeva.

3.1.2. Otapala i reagensi

- Etanol, 96 %-tni (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Etanol, 50 %-tni
  Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 520,8 mL 96 %-tnog etanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Metanol, 100 %-tni, (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol 80 %-tni
- Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 800 mL 100 %-tnog metanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Na_2CO_3) (Lach-Ner, Neratovice Češka)
- Zasićena topina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
  - Priprema: 200 g anhidrida natrijevog karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 sata filtrira.
- Galna kiselina, $C_7H_6O_5$ (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Standard galne kiseline
  - Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 500 mg galne kiseline te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu

volumena 100 mL i otopi u danom volumenu. Nakon toga se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- Aluminijev klorid (aluminij-klorid-heksahidrat, p.a.) ($AlCl_3 \times 6H_2O$) (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid, 10 %-tni
    - Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 1 g aluminijevog klorida koji se otopi u 5 mL destilirane vode te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL koja se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Kalijev acetat, CH_3CO_2K (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev acetat, 1M
    - Priprema: Odvaže se 9,845 g kalijevog acetata u staklenoj čašici i otopi u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Standard kvercetina (100 mg/L) (Extrasynthese, Lyon, Francuska).
    - Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 10 mg standarda kvercetina te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u danom volumenu. Potom se do oznake nadopuni metanolom.
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 % (HCl) (Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96 %-tnom etanolu)
    - Priprema: U odmjernu tikvicu volumena 100 mL otpipetira se 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) i nadopuni metanolom (96 %) do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl
    - Priprema: U odmjernu tikvicu volumena 100 mL otpipetira se 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Kafeinska kiselina ($C_9H_8O_4$) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)

- Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje odvaže se 10 mg standarda kafeinske kiseline te se pomoću 5 mL 80 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u danom volumenu. Potom se do oznake nadopuni 80 %-tnim metanolom.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern &Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Električni mlinac (Imetec Dolcevita CG1, Italy)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (VWR UV-PC Spectrophotometer)
- Tehnička vaga Mettler (točnost ± 0,01g)
- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)

Pribor:

- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Plastične kivete volumena 50 mL
- Menzure (100 mL i 1000 mL)
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL i 1000 mL)
- Pipete (5 mL, 10 mL, 20 mL)
- Plastične lađice za vaganje
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL i 200 mL)
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevci
- Plastična žličica
- Stakleni štapić za miješanje

3.2. METODE RADA

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka lista masline provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE) uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine etanola. U ekstraktima lista masline provedeno je određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola te hidroksicimetnih kiselina primjenom spektrofotometrijskih metoda.

3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE)

Na analitičkoj vagi u plastičnoj lađici odvaže se 1 g (± 0,0001) uzorka praha lista masline. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika najprije se postavi celulozni filter papir, a potom jedna mjerica dijatomejske zemlje (~ 2,0 g) (DE, P/N 062819), na koju se zatim dodaje odvagani uzorak i sve dobro promiješa sa štapićem, vodeći pri tom računa da se ne bi oštetio filter na dnu ćelije. Nakon toga ponovno se dodaje dijatomejska zemlja do vrha ćelije (5 mm ispod gornjeg ruba) te se ćelija ručno zatvara. Tako pripremljeni uzorci postavljaju se na ekstrakciju na uređaju Ase Dionex 350®. Otapalo koje je korišteno je 50 %-tna vodena otopina etanola, a ekstrakcija je provedena na način da je variran broj ciklusa ekstrakcije (1 ili 2 ciklusa), vrijeme trajanja ciklusa 5, 10 i 15 min, te temperatura ekstrakcije (60, 80 i 100 °C). Plan eksperimenta napravljen je u računalnom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc) (Tablica 2.)

Nakon završene ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL pomoću lijevka te se nadopune do oznake otapalom koje se koristilo za ekstrakciju (50 %-tna vodena otopina etanola). Naposljetku se pripremljeni ekstrakti prenesu u plastične kivete volumena 50 mL te se skladište na -18 °C do provođenja analiza.

Tablica 2. Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz povišeni tlak iz lista masline

Otapalo	Polarnost otapala (%)	Statičko vrijeme ekstrakcije (min)	Temperatura (°C)	Broj ciklusa ekstrakcije
Etanol	**50**	**5**	**60**	**1**
				2
			80	**1**
				2
			100	**1**
				2
		10	**60**	**1**
				2
			80	**1**
				2
			100	**1**
				2
		15	**60**	**1**
				2
			80	**1**
				2
			100	**1**
				2

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip metode

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (polifenoli). Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida u blago alkalnim uvjetima. Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Priprema ekstrakata

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti.

Ekstrakti lista masline dobiveni ubrzanom ekstrakcijom otapalom uz povišeni tlak prije analize razrijeđeni su 5 puta. Svi ekstrakti razrijeđeni su otapalom, odnosno 50 %-tnom vodenom otopinom etanola.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 100 µL ekstrakta (20 µL ekstrakta i 80 µL 50 %-tne vodene otopine etanola), 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa. Zatim se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi od 50°C (u kupelji od rotavapora). Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm.

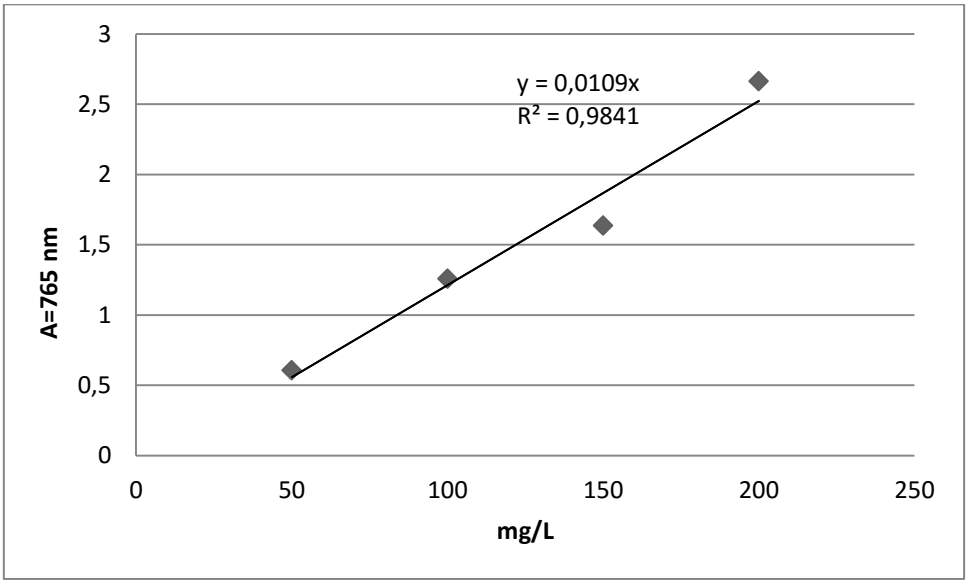
Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina galne kiseline u koncentraciji 5 g/L tako da se odvaže 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola. Otopina se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline se u odmjernim tikvicama od 100 mL rade razrijeđenja tako da se redom otpipetira 1, 2, 3 i 5 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i do oznake nadopune destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 50, 100, 150 i 250 mg/L. Iz svake tikvice se otpipetira 100 µL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u vodenoj kupelji. Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati

izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (Slika 6). Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola.



Slika 6. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0{,}0109\ x$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

$X\ (mg\ g^{-1}) = X\ (mg\ L^{-1}) \times V_{ekstrakta}\ (L) \times$ razrjeđenje /m (g)

Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline mg GAE g^{-1}.

3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode

Reakcijom flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom nastaje obojeni kompleks. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida i mjeri se pri valnoj duljini od 415 nm (Chang i sur., 2002).

Priprema ekstrakata

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. Za potrebe određivanja ukupnih flavonoida ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti.

Ekstrakti lista masline dobiveni ubrzanom ekstrakcijom otapalom uz povišeni tlak prije analize razrijeđeni su 5 puta. Svi ekstrakti razrijeđeni su otapalom, odnosno 50 %-tnom vodenom otopinom etanola.

Postupak određivanja

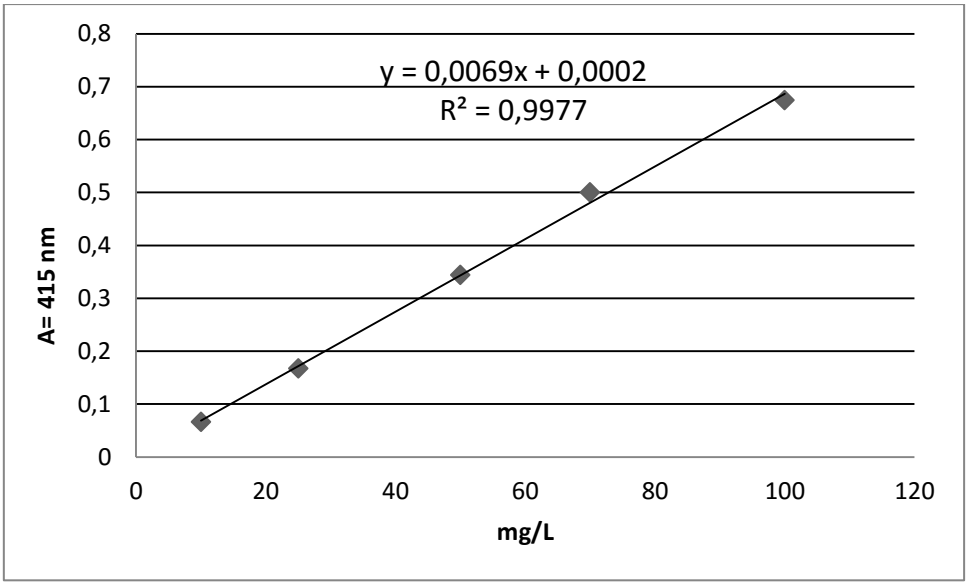
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta (100 µL ekstrakta i 400 µL 50 %-tne vodene otopine etanola), 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda pripreme se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se redom otpipetira 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu te se potom nadopunjavaju 100 %-tnim metanolom do oznake. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L.

U staklenu epruvetu se iz svake tikvice otpipetira 0,5 mL otopine standarda te se redom dodaje 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Za slijepu probu se umjesto otopine standarda uzima 100 %-tni metanol, a umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje se isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa zatim stoji 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 415 nm (slika 7). Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 7. Baždarni pravac za kvercetin

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0{,}0069\ x + 0{,}0002$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

$X\ (mg\ g^{-1}) = X\ (mg\ L^{-1}) \times V_{ekstrakta}\ (L) \times$ razrjeđenje /m (g)

Maseni udjeli ukupnih flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg QE g^{-1}.

3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Princip metode

Metoda za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola provodi se primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Priprema ekstrakata

Ekstrakti se pripremaju kao što je opisano u poglavljima 3.2.1. Za potrebe određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola ekstrakte je potrebno prethodno razrijediti.

Ekstrakti lista masline dobiveni ubrzanom ekstrakcijom otapalom uz povišeni tlak prije analize razrijeđeni su 2 puta. Svi ekstrakti razrijeđeni su otapalom, odnosno 50 %-tnom vodenom otopinom etanola.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta (125 µL ekstrakta i 125 µL 50 %-tne vodene otopine etanola), 250 µL 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca

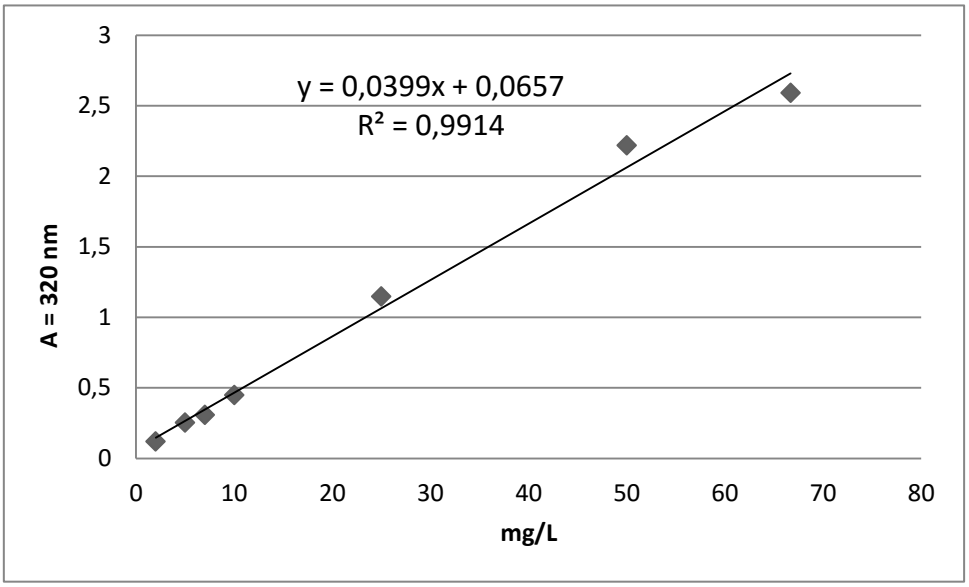
a) Kafeinska kiselina

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina se provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu.

Da bi se iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L pripremila razrjeđenja od 2, 5, 7, 10, 25, 50 i 66,7 mg/L potrebno je iz otopine alikvota redom otpipetirati: 0.2, 0.5, 0.7, 1, 2.5, 5 i 6.67 mL u odmjerne tikvice od 10 mL. Tikvice se zatim do oznake nadopune 80 %-tnim metanolom. Za slijepu probu se uzima 80 %-tni metanol umjesto otopine alikvota.

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 320 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije kafeinske kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 320 nm (slika 8). Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 8. Baždarni pravac za kafeinsku kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0{,}0399X + 0{,}0657$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L).

$X\ (mg\ g^{-1}) = X\ (mg\ L^{-1}) \times V_{ekstrakta}\ (L) \times$ razrjeđenje /m (g)

Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina izraženi su kao ekvivalent kafeinske kiseline mg CAE g^{-1}.

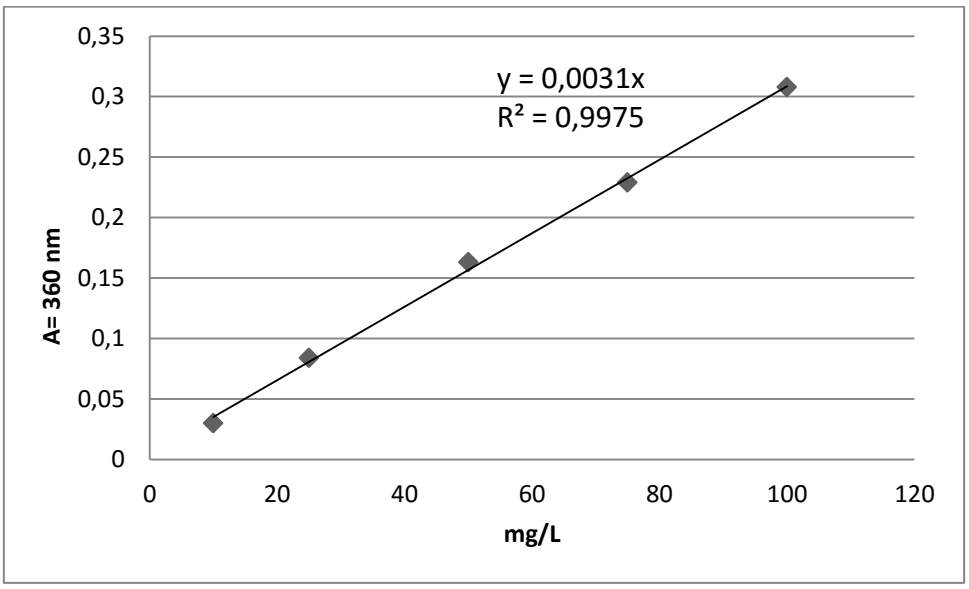
b) Kvercetin

Kvantifikacija ukupnih flavonola provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

Za pripremu razrjeđenja: 10, 25, 50, 75 i 100 mg/L iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetirati 1, 2.5, 5, 7.5 i 10 mL otopine alikvota i nadopuniti do oznake 100%-tnim metanolom. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda koristi 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu redom se otpipetira 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 360 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 360 nm (slika 9). Koncentracija ukupnih flavonola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Baždarni pravac za kvercetin

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0{,}0031\ x$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kverecetina (mg/L).

$X\ (mg\ g^{-1}) = X\ (mg\ L^{-1}) \times V_{ekstrakta}\ (L) \times$ razrjeđenje /m (g)

Maseni udjeli ukupnih flavonola izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg QE g^{-1}.

3.2.5. Statistička analiza

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 17). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije. Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome istraživanju ispitivana je učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (dalje: ASE ekstrakcija).

ASE ekstrakcija fenolnih spojeva iz svih uzorka lista masline provedena je uz upotrebu 50 %-tne vodene otopine etanola kao otapala. Rezultati prijašnjih istraživanja potvrdili su da je etanol učinkovito otapalo za izolaciju bioaktivnih spojeva iz lista masline primjenom ASE ekstrakcije (Herrero i sur., 2012, Taamalli i sur., 2012), a ispitivanjem utjecaja udjela etanola u vodenoj otopini, optimalnim se pokazala 50 %-tna vodena otopina (Xynos i sur., 2014), stoga je i u ovom istraživanju odabrana kao ekstrakcijsko otapalo.

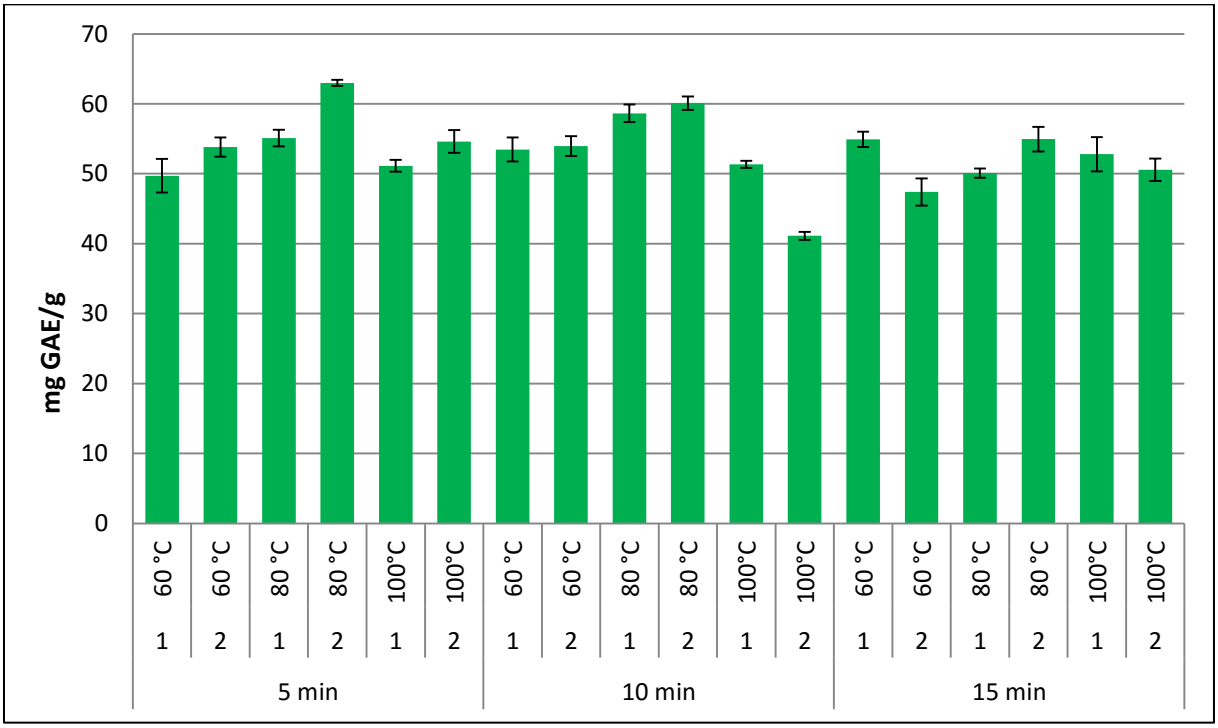
ASE ekstrakcija je provedena variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta), temperature ekstrakcije (60 °C, 80 °C i 100 °C) te broja ciklusa ekstrakcije (1 ili 2 ciklusa).

Rezultati i rasprava su podijeljeni u tri podpoglavlja, a u svakome od njih je prikazano kako gore navedeni parametri utječu na masene udjele ukupnih fenola, flavonoida, te hidroksicimetnih kiselina i flavonola (Slika 10, 11, 12 i 13).

Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavonola određeni su spektrofotometrijski i prikazani su grafički kao srednja vrijednost i standardna pogreška dvaju paralelnih mjerenja.

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni te su na temelju dobivenih rezultata određeni statistički signifikantni utjecaji ispitivanih parametara na masene udjele ispitivanih spojeva (Tablica 3, 4, 5 i 6).

4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA



Slika 10. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g) izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 3. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih fenola izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	**n**	**Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g)**
Temperatura (°C)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
60	12	52.21 ± 0.42^{a}
80	12	56.97 ± 0.42^{b}
100	12	50.27 ± 0.42^{c}
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
5	12	54.56 ± 0.42^{a}
10	12	$53.10 \pm 0.42^{a,b}$
15	12	51.79 ± 0.42^{b}
Broj ciklusa		$p = 0.60^{\ddagger}$
1	18	53.02 ± 0.34^{a}
2	18	53.28 ± 0.34^{a}
Prosječna vrijednost	36	53.15±0.24

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva (UF) u listu masline kretali su se u rasponu od 62,98 mg GAE/g do 41,13 mg GAE/g (Slika 10), s prosječnom vrijednošću 53,15±0,24 mg GAE/g (Tablica 3). Najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u listu masline (62,98 mg GAE/g) primjenom ASE ekstrakcije određena je u ekstraktima koji su dobiveni pri temperaturi od 80 °C, uz dva ciklusa ekstrakcije i uz statičko vrijeme ekstrakcije od 5 minuta.

Talhaoui i suradnici (2014) određivali su udjel polifenolnih spojeva u listu masline španjolskog kultivara *Sikita* primjenom HPLC-DAD-TOF-MS metode. Ekstrakcija je provedena s vodenom otopinom metanola (80 %, v/v) pomoću Ultra-Turrax IKA® homogenizatora te ultrazvučne kupelji (40 kHz). Identificirano i kvantificirano je ukupno 30 različitih fenolnih spojeva, a maseni udjeli svih kvantificiranih fenolnih spojeva kretali su se u rasponu 52,13 mg GAE/g do 60,64 mg GAE/g što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovome radu.

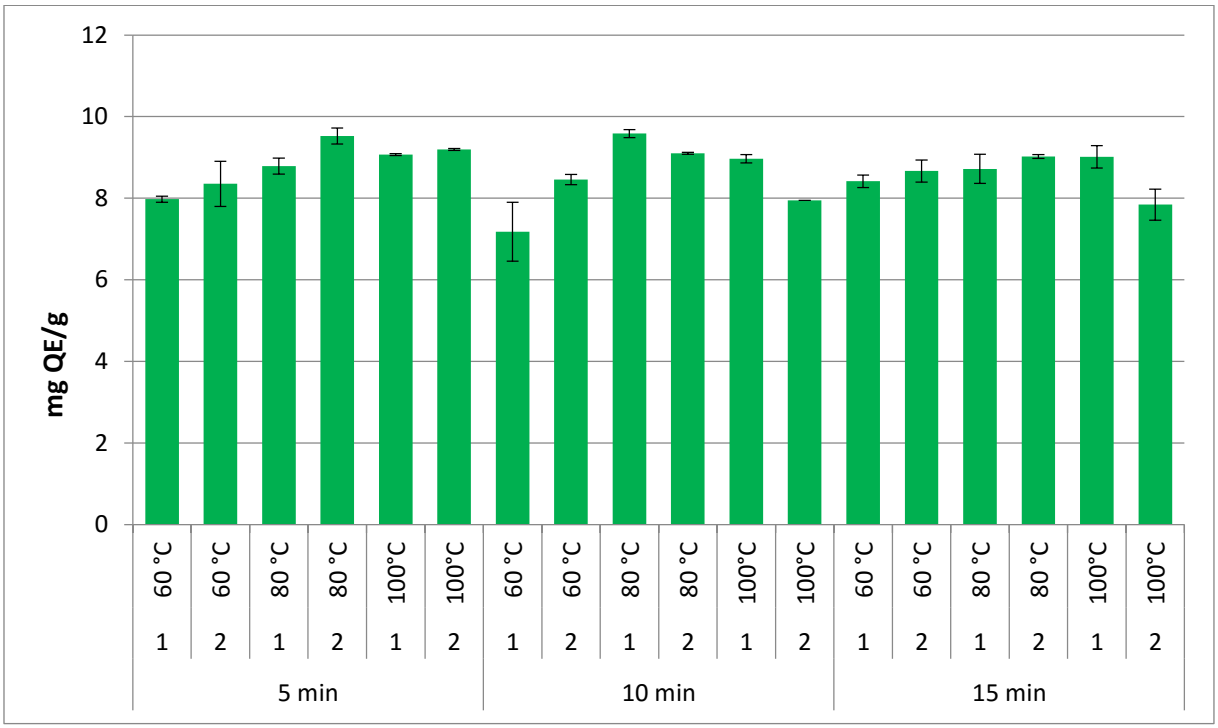
Ako se razmotri utjecaj temperature na masene udjele UF dobiveni rezultati pokazuju da je temperatura značajno utjecala na prinos UF ($p \leq 0.01$). Utjecaj temperature (50−200 °C) i statičkog vremena ekstrakcije (5−30 min) na sadržaj polifenolnih spojeva u listu majčine dušice (*Thymus vulgaris*) primjenom ASE ekstrakcije uz vodu kao ekstrakcijsko otapalo ispitivali su Vergara-Salinas i sur. (2012). Dobiveni rezultati pokazuju da porast temperature do 100 °C ima pozitivan utjecaj, dok više temperature negativno utječu na iskorištenje polifenolnih spojeva. Također, dobiveni rezultati upućuju da porastom temperature od 60 °C do 80 °C, prinos polifenolnih spojeva raste, dok se daljnjim povećanjem na 100 °C sadržaj polifenolnih spojeva smanjuje. Smatra se da se pri višim temperaturama ekstrakcije dio hemiceluloze hidrolizira do kiselina koje dalje mogu katalizirati hidrolizu preostale hemiceluloze. Utjecaj tih reakcija naročito je vidljiv pri višim temperaturama (>100 °C), stoga i duže vrijeme ekstrakcije do određene mjere pogoduje boljem iskorištenju polifenolnih spojeva, obzirom se gore navedenom hidrolizom kroz duže vrijeme pospješuje ekstrakcija polifenolnih spojeva iz stanice (Pérez-Jiménez i Torres, 2011). Pokazano je također da se uslijed hidrolitički potaknutih reakcija, mogu otpuštati i reducirajući šećeri, koji pak reagiraju sa Folin Ciocalteu reagensom te stoga utječu na rezultate analize ukupnih fenola (Kumazawa i sur., 2001).

U istraživanju Xynos i sur. (2012) ispitivali su optimalne uvjete za izolaciju oleuropeina iz lista masline primjenom ASE ekstrakcije. Konstantni parametri su bili statičko vrijeme ekstrakcije od 10 minuta i 2 ekstrakcijska ciklusa, a varijabilni parametri su bili tip

otapala i temperatura. Kao otapalo su koristili etanol, vodu i vodenu otopinu etanola (40:60, v/v), pri temperaturama od 40 ºC, 50 ºC, 115 ºC i 150 ºC. Najveći prinos (41,5 %) ostvaren je uz vodu pri 150 ºC. Utvrđeno je da se sadržaj polifenolnih spojeva u dobivenim ekstraktima povećava porastom temperature kada se voda koristi kao ekstrakcijsko otapalo (3,4 % pri 150 ºC vs. 1,7 % pri 50 ºC).

Osim temperature, na prinose ciljanih spojeva tijekom ASE ekstrakcije imaju i vrijeme ekstrakcije kao i broj ciklusa. Rezultati istraživanja Jentzer i sur. (2015) potvrđuju značajan utjecaj statičkog vremena (1-7 min) i broja ciklusa (1, 2, 3) na sadržaj bioaktivnih spojeva u listu stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ekstrahiranih ASE ekstrakcijom. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su najveće koncentracije bioaktivnih spojeva određene u ekstraktima ekstrahiranim uz statičko vrijeme ekstrakcije 4 min te jedan ciklus ekstrakcije. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem također ukazuju na značajan utjecaj statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa na prinos UF, pri čemu su najviše vrijednosti ostvarene pri najnižem statičkom vremenu od 5 min, a najniže pri 15 min, dok broj ciklusa nije značajno utjecao na prinos UF. Ispitivajući parametre ASE ekstrakcije za izolaciju oleuropeina iz lista masline Xynos i sur. (2014) također su potvrdili da se uz vodenu otopinu etanola (43:57, v/v) najbolji prinosi ostvaruju uz statičko vrijeme ekstrakcije 5 min te jedan ciklus ekstrakcije. Kraće statičko vrijeme ekstrakcije uz veće prinose bioaktivnih spojeva svakako je velika prednost ASE ekstrakcije u usporedbi s ostalim tehnikama, a razlog tome vjerojatno leži u činjenici da dužim vremenom ekstrakcije ipak dolazi do nepoželjnih reakcija degradacije polifenola, uslijed ekstrakcije oksidacijskih enzima kao i različitih slobodnih radikala koji mogu reagirati sa ekstrahiranim fenolnim spojevima (Biesaga i Pyrzyńska, 2013).

4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA



Slika 11. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (mg QE/g) izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 4. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih flavonoida izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	**n**	**Maseni udjeli ukupnih flavonoida (mg QE/g)**
Temperatura (°C)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
60	12	8.17 ± 0.08^{a}
80	12	9.12 ± 0.08^{b}
100	12	8.67 ± 0.08^{c}
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p=0.06^{\ddagger}$
5	12	8.82 ± 0.08^{a}
10	12	8.54 ± 0.08^{a}
15	12	8.61 ± 0.08^{a}
Broj ciklusa		$p=0.63^{\ddagger}$
1	18	8.63 ± 0.07^{a}
2	18	8.68 ± 0.07^{a}
Prosječna vrijednost	36	8.66±0.05

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Koncentracije ukupnih flavonoida (FL) u listu masline određene su u rasponu od 7,18 mg QE/g do 9,58 mg QE/g (Slika 11), s prosječnom vrijednošću od 8,66±0,05 mg QE/g (Tablica 4). Najveća koncentracija FL u listu masline (9,58 mg QE/g) primjenom ASE ekstrakcije određena je u ekstraktima koji su dobiveni pri temperaturi od 80 °C, uz jedan ciklus ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 10 minuta.

Slične rezultate za masene udjele FL dobili su Abaza i sur., (2011) u svom istraživanju. Kao otapala koristili su vodene otopine metanola (20:80, v/v), etanola (30:70, v/v), acetona (20:80, v/v) i destiliranu vodu. U izolaciji flavonoidnih spojeva iz svježih, odnosno suhih listova masline, kao najbolje ekstrakcijsko otapalo pokazao se metanol (11,78±1,41 mg CTE (ekvivalent katehina)/g; 21,47±2,56 mg CTE/g), zatim etanol (8,69±0,69 mg CTE/g; 15,83±1,26 mg CTE/g), aceton (7,32±0,65 mg CTE/g; 13,33±1,19 mg CTE/g) te destilirana voda (3,42±0,34 mg CTE/g; 6,23±0,62 mg CTE/g). Ipak, neka istraživanja pokazuju i značajno niže, kao i značajno više vrijednosti FL od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Iako je udio FL u listu masline 12 različitih španjolskih i grčkih kultivara iznosio 13-27 % u udjelu UF, u istim su određene značajno niže vrijednosti (1,82-3,02 mg/g) (Goulas i sur., 2010). Nadalje, Salah i sur., (2012) određivali su polifenolni sastav u ekstraktima lista tuniških maslina koristeći vodenu otopinu etanola (30:70, v/v) i maceraciju tijekom 7 dana pri sobnoj temperaturi. Sadržaj FL u ekstraktima kretao se u rasponu od 56,57±6,0 mg CTE/g do 125,64±3,36 mg CTE/g, što je značajno više u usporedbi sa dobivenim rezultatima u ovoj studiji. Razlike u rezultatima mogu se pripisati različitim ekstrakcijama, no vjerojatno veći utjecaj ima izračun rezultata preko različitih standarada (katehin *vs*. kvercetin).

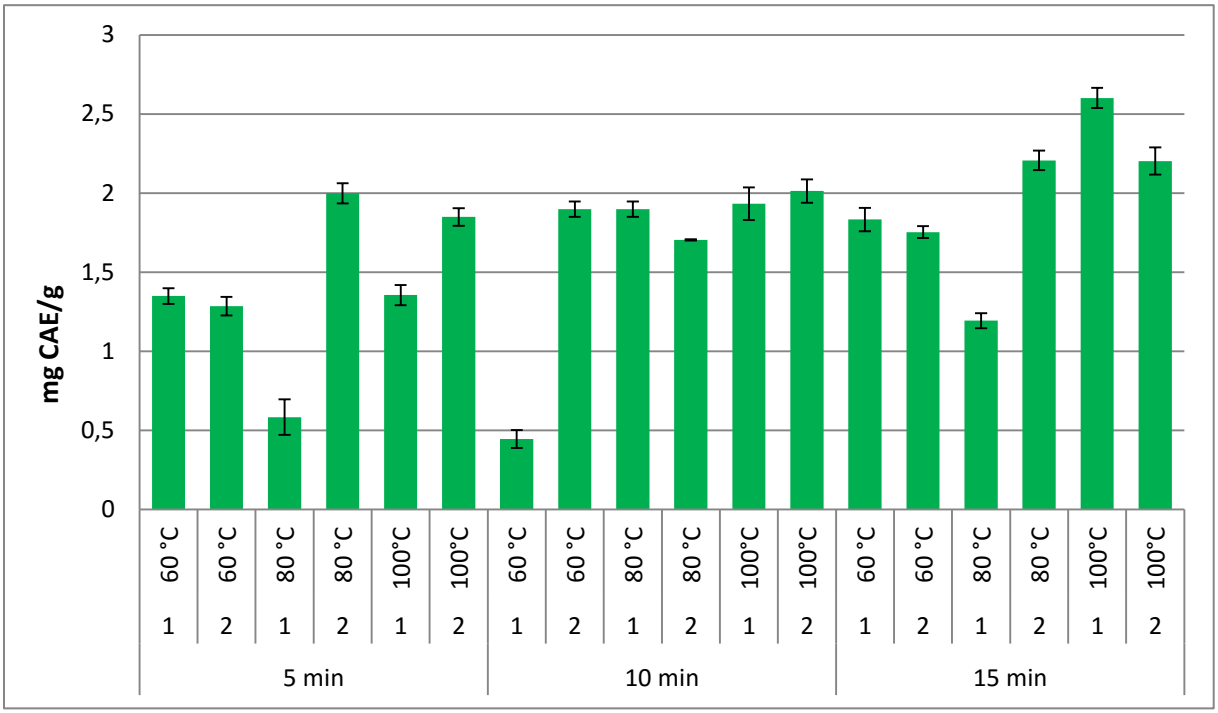
Slično kao i za masene udjele UF, utjecaj temperature bio je signifikantan i na sadržaj FL te su najviši prinosi ostvareni pri 80 ºC. Liu i sur. (2015), između ostalog, ispitivali su i utjecaj temperature (25 °C do 95 °C) na ekstrakciju FL iz ljekovite biljke Bajkalske kapice (*Scutellaria baicalensis* Georgi) koristeći vodenu otopinu etanola (40:60, v/v) te su potvrdili pozitivan utjecaj porasta temperature na izolaciju FL do 60 °C, nakon čega slijedi degradacija ovih spojeva. Özkaynak Kanmaz (2014) u svom istraživanju izolacije FL primjenom ASE ekstrakcije iz gotovog obroka na bazi lanenih sjemenki (*Linum usitatissimum* L.) potvrdio je signifikantnu povezanost temperature i statičkog vremena ekstrakcije. Ispitivane su temperature 160 ºC, 170 ºC te 180 ºC, uz statička vremena ekstrakcije 5, 15, 30 i 60 min. Dobiveni rezultati pokazuju da se najveći prinosi FL ostvaruju pri višim temperaturama i

dužim vremenima ekstrakcije. To se može objasniti činjenicom da se porastom temperature povećava koeficijent difuzije vode, što pospješuje bolje prodiranje otapala u matriks te tako utječe na učinkovitost ekstrakcije. Obzirom da koeficijent difuzije ovisi i o tlaku, koji je tijekom ASE ekstrakcije konstantan, može se zaključiti da je u izravnoj funkciji temperature.

Razmatrajući utjecaje vremena ekstrakcije i broja ciklusa na masene udjele FL, statistički rezultati pokazuju da na sadržaj FL u ovom istraživanju nisu imali značajan utjecaj ($p \leq 0,01$). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja Luthria (2008) te podupiru činjenicu da statičko vrijeme ekstrakcije značajno ne utječe na sadržaj bioaktivnih spojeva u listićima peršina (*Petroselinum crispum*) ekstrahiranih ASE ekstrakcijom. Da statičko vrijeme nema utjecaj na ASE ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lista masline potvrdili su i Herrero i sur. (2011).

Ipak, neka istraživanja navode i drugačije rezultate. Tako Rodríguez-Solana i sur. (2014) u svome radu navode kako veći broj ciklusa i dulje ekstrakcijsko vrijeme rezultiraju većim prinosima bioaktivnih spojeva ekstrahiranih iz sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Miller) primjenom ASE ekstrakcije. Također, rezultati istraživanja Kanmaz (2014) potvrđuju kako statičko vrijeme ekstrakcije ima značajan utjecaj na sadržaj FL u sjemenkama lana (*Linum usitatissimum* L.) ekstrahiranih ASE ekstrakcijom. Povećanjem vremena ekstrakcije sa 5 na 60 minuta povećava se i sadržaj FL sa 4,59±5,61 na 71,04±5,88 mg luteolina/100 g.

4.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA I FLAVONOLA



Slika 12. Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g) izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 5. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih hidroksicimetnih kiselina izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	**n**	**Maseni udjeli ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg CAE/g)**
Temperatura (°C)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
60	12	1.39 ± 0.02^{a}
80	12	1.60 ± 0.02^{b}
100	12	1.99 ± 0.02^{c}
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
5	12	1.40 ± 0.02^{a}
10	12	1.62 ± 0.02^{b}
15	12	1.96 ± 0.02^{b}
Broj ciklusa		$p \leq 0.01^{\dagger}$
1	18	1.47 ± 0.02^{a}
2	18	1.86 ± 0.02^{b}
Prosječna vrijednost	36	1.66±0.01

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

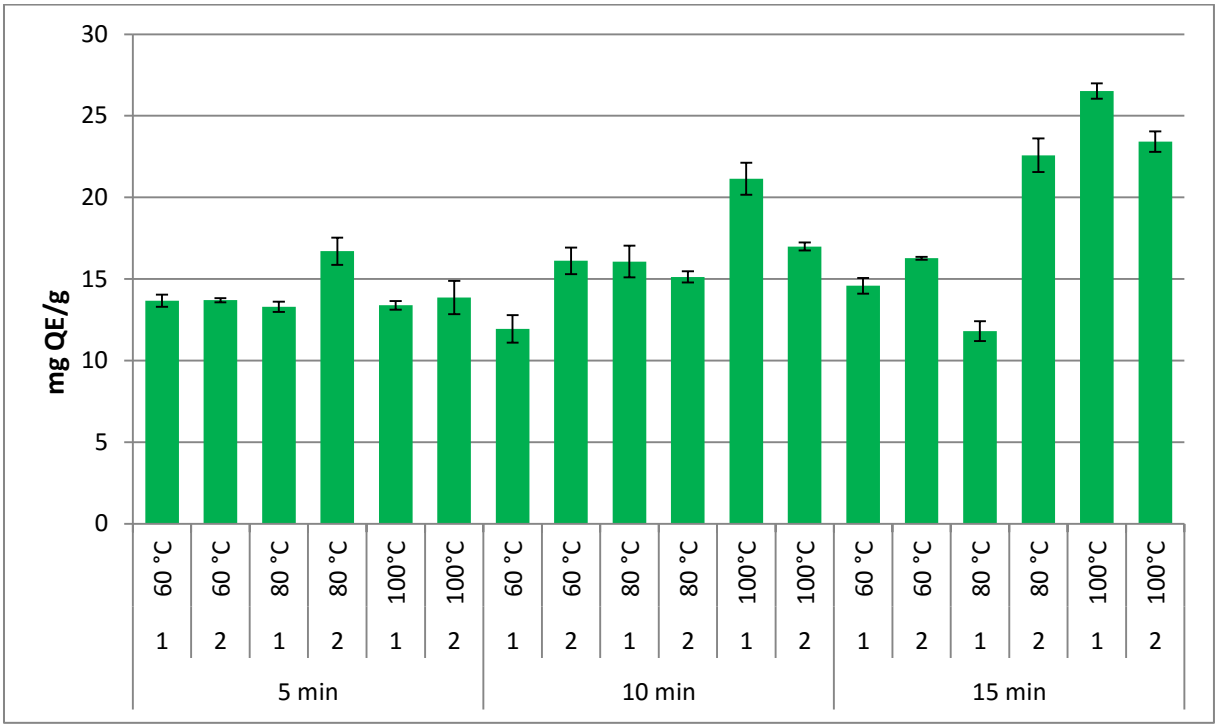
Koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina (HCK) u listu masline određene su u rasponu od 0,44 mg CAE/g do 2,60 mg CAE/g (Slika 12), s prosječnom vrijednošću od 1,66±0,01 mg CAE/g (Tablica 5). Najveća koncentracija HCK u listu masline (2,60 mg CAE/g) primjenom ASE određena je u ekstraktima koji su dobiveni pri temperaturi od 100 °C, uz jedan ciklus ekstrakcije, uz statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta.

Xie i sur., (2015) u svome istraživanju određivali su fenolni sastav lista masline primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Ekstrakcija je provedena pri sljedećim uvjetima: (i) otapalo: etanol (75 %, v/v); (ii) temperatura 50 °C; (iii) snaga ultrazvuka od 600 W; (iv) vrijeme ekstrakcije od 3 minute; (v) tlak od 25 kPa. Pri ovim uvjetima u listu masline identificirane su sljedeće kiseline: kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska i klorogenska kiselina. Najzastupljenija je kafeinska kiselina (2,17±0,02 mg/g), zatim klorogenska kiselina (0,89±0,11 mg/g), ferulinska kiselina (0,68±0,07 mg/g), a najmanje zastupljena je *p*-kumarinska kiselina (0,11±0,05 mg/g). Ako bi identificirane HCK u ovom istraživanju promatrali kao sumu mogli bi zaključiti da su naši rezultati u skladu s ovim vrijednostima.

Rezultati statističke analize pokazuju da je na sadržaj ukupnih HCK u ovom istraživanju značajan utjecaj imala temperatura, vrijeme ekstrakcije kao i broj ciklusa ekstrakcije ($p \leq 0,01$). Optimalni parametri ekstrakcije u ovome istraživanju pri kojima je određena najveća koncentracija ukupnih HCK u listu masline primjenom ASE ekstrakcije detektirana je u ekstraktima koji su dobiveni pri temperaturi od 100 °C, uz dva ciklusa ekstrakcije te uz statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturom, jer je stabilnost HCK tijekom povišenih temperatura već ranije potvrđena u radu Bursać Kovačević i sur. (2016). Također, tijekom skladištenja soka od crnog ribiza (*Ribes nigrum* L.) pri sobnoj temperaturi, u usporedbi s flavonol glikozidima i antocijanima, HCK u pokazale najbolju stabilnost (Mäkilä i sur., 2016).

Nadalje, u istraživanju Vergara-Salinas i sur. (2012) ispitivan je utjecaj temperature (50-200 °C) i statičkog vremena ekstrakcije (5-30 minuta) na sadržaj hidroksicimetnih kiselina (HCK) u listu majčine dušice (*Thymus vulgaris*) primjenom ASE ekstrakcije uz vodu kao ekstrakcijsko otapalo. Rezultati pokazuju da porastom temeprature od 50 °C do 80 °C dolazi do značajnog povećanja masenog udjela HCK s 5,57±0,06 mg CAE/g na 7,39±0,24 mg CAE/g. Daljnim porastom temperature dolazi do degradacije ovih spojeva. Slično ponašanje uočeno je i povećanim statičkim vremenom ekstrakcije, odnosno produljenje vremena ekstrakcije rezultira nižim prinosima HCK. Stoga se kao optimalni parametri za ekstrakciju

HCK iz lista majčine dušice pokazala temepratura od 100 °C uz statičko vrijeme ekstrakcije od 5 minuta. Također, Hossain i sur., (2011) u istraživanju polifenolnog sastava ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), mažurana (*Origanum majorana* L.) i origana (*Origanum vulgare* L.) primjenom ASE ekstrakcije, uočili su kako se porastom temperature sa 150 °C na 200°C povećavaju prinosi HCK, odnosno kafeinske kiseline s 0,22 mg/g na 0,42 mg/g iz ružmarina, s 0,18 mg/g na 0,28 mg/g iz mažurana te sa 0,36 mg/g na 0,64 mg/g iz origana.



Slika 13. Maseni udjeli ukupnih flavonola (mg QE/g) izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 6. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih flavonola izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	**n**	**Maseni udjeli ukupnih flavonola (mg QE/g)**
Temperatura (°C)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
60	12	14.38 ± 0.19^{a}
80	12	15.93 ± 0.19^{b}
100	12	19.22 ± 0.19^{c}
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
5	12	14.10 ± 0.19^{a}
10	12	16.23 ± 0.19^{b}
15	12	19.20 ± 0.19^{c}
Broj ciklusa		$p \leq 0.01^{\dagger}$
1	18	15.82 ± 0.16^{a}
2	18	17.20 ± 0.16^{b}
Prosječna vrijednost	36	16.51±0.11

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

U ekstraktima lista masline dobivenim ASE ekstrakcijom, maseni udjeli ukupnih flavonola (FLA) određeni su u rasponu od 11,80 mg QE/g do 26,52 mg QE/g (Slika 13), s prosječnom vrijednošću od 16,51±0,11mg QE/g (Tablica 6). Najviši prinosi ukupnih FLA (26,52 mg QE/g) dobiveni su pri temperaturi od 100 °C, uz statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta uz jedan ciklus ekstrakcije.

Khaliq i sur. (2015) su određivali polifenolni sastav u ekstraktima lista osam različitih kultivara pakistanskih maslina primjenom HPLC-DAD metode, koristeći vodu kao ekstrakcijsko otapalo i konvencionalnu ekstrakciju pri 40 ºC. Od pojedinačnih flavonola u listu masline identificirali su sljedeće spojeve sa prosječnim masenim udjelima: rutin 34,56±0,03 mg QE/g; kvercetin 16,41±0,01 mg QE/g i kempferol 7,38±0,02 mg QE/g. Dobivene rezultate za ukupne FLA nije moguće usporediti s dostupnim literaturnim podacima obzirom da nije pronađena niti jedna znanstvena publikacija sa spektrofotometrijskim određivanjem FLA u ASE ekstraktu lista masline.

Ako se razmotre utjecaji ispitivanih ekstrakcijskih parametara na ekstrakciju ukupnih FLA u ASE ekstraktima lista masline, statistički rezultati pokazuju da su od signifikantnog značaja bila sva tri ispitivana parametra ($p \leq 0,01$). Optimalni uvjeti za ekstrakciju FLA iz lista

masline primjenom ASE ekstrakcije u ovome radu su: temperatura od 100 °C, dva ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta, obzirom se pri navedenim uvjetima ostvaruju najviši prinosi ukupnih FLA.

Temperatura od 100 °C i statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta također su se pokazali kao optimalni parametri za ekstrakciju flavonola iz lista majčine dušice primjenom ASE ekstrakcije u istraživanju koje su proveli Vergara-Salinas i sur. (2012).

Bozan i Altinay (2014) u svom radu ispitivali su utjecaj temperature (50-120 °C) i statičkog vremena ekstrakcije (5-30 min) na sadržaj flavan-3-ola u ekstraktima sjemenki grožđa dobivenih ASE ekstrakcijom. Dobiveni rezultati pokazuju da porast temperature od 50 ºC do 120 °C rezultira povećanjem prinosa ovih bioaktivnih spojeva za 2,5 puta, dok porast temperature od 50 °C do 80 °C rezultira povećanjem prinosa flavan-3-ola za 1,5 puta. Autori nadalje pojašnjavaju da povišena temperatura pospješuje topljivost analita i povećava brzinu difuzije čime se poboljšava cijeli proces ekstrakcije. Ispitujući utjecaj vremena i broja ciklusa ekstrakcije, najviši prinosi ovih bioaktivnih spojeva dobiveni su tijekom 20–minutne ekstrakcije i tijekom dva ciklusa ekstrakcije. Iz navedenoga možemo zaključiti da su i rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu s ovim literaturnim podacima jer upućuju na veće iskorištenje FLA uz duže statičko vrijeme ekstrakcije i veći broj ciklusa ekstrakcije.

Kao i u ovome radu, u istraživanju Wibisono i sur., (2009) broj ciklusa ekstrakcije značajno je utjecao na prinose fenolnih spojeva koji su ekstrahirani iz komine jabuka primjenom ASE ekstrakcije. U njihovom radu, najviši prinosi dobiveni su uz 3 ekstrakcijska ciklusa, pri čemu je glavnina ovih spojeva (∼ 90 %) ekstrahirana u prva dva ciklusa, dok je trećim ciklusom ekstrahiran ostatak (∼ 9 %).

Na temelju svih dobivenih rezultata može se općenito zaključiti da većem iskorištenju polifenolnih spojeva iz lista masline primjenom ASE ekstrakcije svakako doprinosi porast temperature (do 80 ºC). Također, ispitivani parametri ASE ekstrakcije, poput statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije, različito utječu na različite skupine spojeva, stoga je za izolaciju svake ciljane skupine spojeva potrebno zasebno optimirati parametre ASE ekstrakcije.

5. ZAKLJUČCI

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

1. U ovom istraživanju, primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima iz lista masline sorte *Oblica* izolirani su fenolni spojevi sa prosječnim vrijednostima: (i) 53,15±0,24 mg GAE/g za ukupne fenole; (ii) 16,51±0,11 mg QE/g za ukupne flavonole; (iii) 8,66±0,05 mg QE/g za ukupne flavonoide; (iv) 1,66±0,01 mg CAE/g za ukupne hidroksicimetne kiseline.

2. Najveći sadržaj ukupnih fenola izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku iznosio je 62,98 mg GAE/g. Optimalni uvjeti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u ovome radu su: temperatura od 80 °C, dva ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 5 minuta.

3. Najveći sadržaj ukupnih flavonoida izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku iznosio je 9,58 mg QE/g. Optimalna temperatura za ekstrakciju flavonoidnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u ovome radu je temperatura od 80 °C. Razmatrajući utjecaje vremena ekstrakcije i broja ciklusa, podaci pokazuju da na sadržaj flavonoida u ovom istraživanju nisu imali značajan utjecaj.

4. Najveći sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku iznosio je 2,60 mg CAE/g. Optimalni uvjeti za ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u ovome radu su: temperatura od 100 °C, dva ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta.

5. Najveći sadržaj ukupnih flavonola izoliranih iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku iznosio je 26,52 mg QE/g. Optimalni uvjeti za ekstrakciju flavonola iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u ovome radu su: temperatura od 100 °C, dva ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme ekstrakcije od 15 minuta.

6. LITERATURA

Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Haddada, M. F., Methenni, K., Zarrouk, M. (2011) Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y aceites*, **62**, 96-104.

Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M. (2015) Olive tree (*Olea europeae* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*. **4**, 682-698.

Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., Shahidi, F. (2001) Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem*. **49**, 1410–1416.

Alcázar Román, R., Amorós, J.A., Pérez de los Reyes, C., García Navarro, F.J., Bravo, S., (2014) Major and trece element content of olive leaves. *Olivæ* **119**, 1-7.

Anonymous 1 (2015) The Peace Abbey, <http://www.peaceabbey.org>. Pristupljeno 1. srpnja, 2016.

Anonymous 2 (2015) Ase 200 accelerated solvent extractor, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4036-ASE200_Bro.pdf>. Pristupljeno 1. srpnja, 2016.

Ansari, M., Kazemipour, M., Fathi, S. (2011) Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. *J. Iran. Chem. Soc.* **8,** 38-47.

Anter, J., Tasset, I., Demyda-Peyrás, S., Ranchal, I., Moreno-Millán, M., Romero-Jimenez, M., Muntané, J., Luque De Castro, M. D., Mũnoz-Serrano, M., Alonso-Moraga Á. (2014) Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptoticeffects of the olive oil by-product "alperujo," hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutat. Res*. **772**, 25–33.

Apostolakis, A., Grigorakis, S., Makris, D.P. (2014) Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures. *Sep. Purif. Technol*. **128**, 89-95.

Belitz, H.D., Grosch, W., Schierberle, P. (2004) Food Chemistry. 3.izd., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, str. 806-860.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. *Food Chem*. **68**, 457–462.

Benčić, Đ., Cantore, A., Bolarić, S. (2011) Pomometrijska i genetička analiza genotipova Maslina od Luna. 46. hrvatski i 6. međunarodni simopozij agronoma, Opatija.

Biesaga, M., Pyrzyńska, K. (2013) Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem.* **136**, 46-54.

Bouaziz, M., Lassoued, S., Bouallagui, Z., Smaoui, S., Gargoubi, A., Dhouib, A., Sayadi, S. (2008) Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater. bioorg. *Med. Chem*. **16**, 9238-9246.

Bozan, B., Altinay, R.C. (2014) Accelerated Solvent Extraction of Flavan-3-OL Derivatives from Grape Seeds. *Food Sci. Technol. Res*. **20 (2)**, 409-414.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significanse. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Putnik, P., Vukušić, T., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase Plasma, *Food Chem*. **212**, 323-331.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **10**(3), 178-182.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules* **15**,7313-7352.

El, S.N., Karakaya, S. (2009) Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.* **67**, 632-638.

Erdman, J.W. Jr., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J. (2007) Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31- June 1, 2005, Washington, DC. *J. Nutr.* **137**, 718S-737S.

Galanakis, C.M., Tornberg, E., Gekas, V. (2010) Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. **85**, 1148-1155.

Goulas, V., Papoti, V.T., Exarchou, V., Tsimidou, M.Z., Gerothanassis, I.P. (2010) Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3303-3308.

Guinda, A., Castellano, J.M., Santos-Lozano, J.M., Delgado-Hervás, T., Gutiérrez-Adánez, P., Rada, M. (2015) Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *Food Sci. Technol.* **64**, 431-438.

Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N., Kerry, J.P. (2011) Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem.* **126**, 948–955.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572-584.

Heimler, D., Pieroni, A., Tattini, M., Cimato, A. (1992). Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in Olea europaea L. Leaves. *Chromatographia*, **33**, 369-373.

Herrero, M., Temirzoda, T.N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibañez, E. (2011) New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *J. Chromatogr. A.* **1218**, 7511– 7520.

Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol*. **37**, 937-942.

Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Brunton, N.P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**, 339-346.

Howard, L.R., Clark, J.R., Brownmiller, C., (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J. Sci. Food Agr*. **83**(12), 1238-1247.

Japón-Luján, R., Luque De Castro, M. D. (2006b) Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A*, **1136**, 185–191.

Japón-Luján, R., Luque De Castro, M. D. (2007) Static-dynamic superheated liquid extraction of hdroxytyrosol and other biophenols from alperujo (a semisolid residue of the olive oil industry). *J. Agric. Food Chem*. **55**, 3629–3634.

Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M., Luque de Castro, M.D. (2006a) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr*. **1108**, 76-82.

Jentzer, J.B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., Vilarem, G. (2015) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **166**, 561-567.

Kanmaz, E.O. (2014) Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *Eur. Food Res. Technol.* **238**, 85-91.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279-290.

Khaliq, A., Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Jabbar, A., Qamar, I., Khan, A. (2015) Antioxidant activities and phenolic composition of Olive (*Olea europaea*) leaves. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **88**, 16-21.

Khan, Y., Panchal, S., Vyas,N., Butani, A., Kumar, V. (2007) PHCOG REV.: Plant review *Olea europaea*: a phyto-pharmacological review. *Phcog Rev.* **1**, 112-116.

Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M.S., Nakayama, T. (2001) Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem*. **50**, 373-377.

Lee, O.H., Lee, B.Y. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour. Technol*. **101**, 3751-3754.

Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty,K., Kim, Y.C. (2009) Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour. Technol*. **100**, 6107-6113.

Liu, Y., Wang, H., Cai, W. (2015) Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* **52(4)**, 2336-2343.

Lozano-Sánchez, J., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. S., Segura-Carretero, A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2014) Recovering bioactive compounds from olive oil filter cake by advanced extraction techniques. *Int. J. Mol. Sci*. **15**, 16270–16283.

Luthria, D.L. (2008) Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chem.* **107**, 745-752.

Mäkilä, L., Laaksonen, O.A., Alanne, A.L.M., Kortesniemi, M.K., Kallio, H.P.T., Yang, B. (2016) Stability of Hydroxycinnamic Acid Derivatives, Flavonol Glycosides and Anthocyanins in Black Currant Juice. *J. Agric. Food Chem. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01005* IN PRESS

Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol*. **16**, 77-84.

Mert, C., Barut, E., Îpek, A. (2013) Quantitative Seasonal Changes in the Leaf Phenolic Content Related to the Alternate-Bearing Patterns of Olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). *J. Agr. Sci. Tech*. **15**, 995-1006.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.

Mottaleb, M.A., Sarker, S.D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology, 3.izd., (Sarker, S.D., Nahar, L., ured.), Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plantsextraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **703**, 8-18.

Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Khodir, M. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. *Food Chem.* **187**, 507-516.

Özkaynak Kanmaz, E. (2014) Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *Eur. Food Res. Technol*. **238**, 85-91.

Panizzi L., Scarpati, M.L., Oriente, E.G. (1960) Structure of oleuropein bitter glycoside with hypotensive action of olive oil. Note II. *Gazzetta Chimica Italiana*. **90**, 1449–1485.

Pereira, A.P, Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A. (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* **12**, 1153-1162.

Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L. (2011) Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J. Agric. Food Chem.* **59 (24)**, 12713-12724.

Pérez-Serradilla, J. A., Japón-Luján, R., Luque De Castro, M. D. (2008) Static–dynamic sequential superheated liquid extraction of phenols and fatty acids from alperujo. *Anal. Bioanal. Chem*. **392**, 1241–1248.

Piné, Q. R., Sánchez, L. J., Herrero, M., Ibáñez, E., Carretero, S. A., i Gutiérrez, F. A. (2012) HPLC–ESI–QTOF–MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochem. Anal.* **24**, 213–223.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Penić, M., Fegeš, M., Dragović-Uzelac, V. (2016) Microwave-assisted extraction (MAE) of Dalmatian sage leafs for the optimal yield of polyphenols: HPLC-DAD identification and quantification, *Food Anal. Method*. **9(8)**, 2385-2394.

Rahmanian, N., Jafari, S. M., Galanakis, C. M. (2014). Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 1-18.

Rahmanian, N., Jafari, S.M., Wani, T.A. (2015) Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends Food Sci. Technol*. **42**, 150-172.

Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V. (2006) Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 434-440.

Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L. (1996) Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.* **68**, 1033-1039.

Rodríguez-Solana, R., Salgado, J.M., Domínguez, J.M., Cortés-Diéguez, S. (2014) Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extractionand Soxhlet techniques. *Ind. Crops Prod.* **52**, 528-536.

Romero-García, J.M., Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Moya, M., Ruiz, E., Fernández-Bolaños, J., Castro, C. (2016) Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chem.* **210**, 457-465.

Saha, S., Walia, S., Kundu, A.,Sharma, K., Paul, R.K. (2015) Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **177,** 369-375.

Salah, M.B., Abdelmelek, H., Abderraba, M. (2012) Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med. Chem.* **2**, 107-111.

Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K. (2007) Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Sci. Tech. Int.* **13**, 413-421.

Scalbert, A., Johnson, I., Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* **81**, 2155-2175.

Shadidi, F., Naczk, M. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatog. A.* **1054**, 95-111.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P., (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (Crataegus monogyna) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**(4), 828-834.

Skaltsounis, A.L., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Xynos, N. (2015) Recovery of high added value compounds from olive tree products and olive processing byproducts. U: Olive and olive oil bioactive constituents, (Boskou, D., ured.), AOCS Press, Urbana, Illinois, str. 333-357.

Strikić, F. (2015) Maslina. U: Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije, (Ozimec, R., Mihinica, S., ured.), Tiskara Zelina, Zagreb, str. 88-131.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2012) Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from

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

Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res. Int.* **77,** 92-108.

Therios, I.N. (2008) Olives, CABI, Oxfordshire, str. 1-31.

Valls, J., Millán, S., Martí, M.P., Borrás, E., Arola, L. (2009) Advanced separation methodes of food anthocyanins, isoflavones and flavanol. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 7143-7172.

Vergara-Salinas, J.R., Pérez-Jiménez, J., Lluís Torres, J., Agosin, E., Pérez-Correa, J. R. (2012) Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10920-10929.

Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Terezinha Zani, V., de Souza, D., Morelo Dal Bosco, S. (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr. Hosp.* **31**, 1427-1433.

Wibisono, R., Zhang, J., Saleh, Z., Stevenson, D.E. Joyce, N.I. (2009) Optimisation of accelerated solvent extraction for screening of the health benefits of plant food materials. *Health*, **1**, 220-230.

Xie, P., Huang, L., Zhang, C., Zhang, Y. (2015) Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure-activity relationships. *J. Funct. Foods*, **16**, 460-471.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L. (2012) Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *J. Supercrit. Fluid*, **67**, 89- 93.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L. (2014) Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol*. **122**, 323-330.

Yang, H., Comstock, K., Lopez, L. (2014) Comparison of soxhlet and accelerated solvent extraction for leachable and extractable analysis of packing material. Thermo Scientific Application Note, **1108**, 1-9.

Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Kalthoum-cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., Guiavarc'h, Y. (2015) Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chem.* **184**, 131-139.