

# Izolacija i karakterizacija fenolnih spojeva u listu masline

---

Čengiđ, Lea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:694512>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Lea Čengić**

6925/N

**Izolacija i karakterizacija fenolnih spojeva u  
listu masline**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Kemija i biokemija hrane**

**Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Senka Djaković***

**Zagreb, 2017.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam**

**Zavod za kemiju i biokemiju**  
**Laboratorij za organsku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Nutricionizam**

## **Izolacija i karakterizacija fenolnih spojeva u listu masline**

***Lea Čengić, 00582052038***

### **Sažetak:**

Maslina (*Olea europaea* L.) je malo zimzeleno drvo i vrlo stara biljna vrsta čija uporaba seže daleko u prošlost. Raste pretežito na području Mediterana te se upotrebljava u mnoge svrhe jer obiluje bioaktivnim komponentama s mogućim pozitivnim utjecajem na zdravlje ljudi. U ovom završnom radu provedene su ekstrakcija, pročišćavanje i karakterizacija fenolnih spojeva u listu masline. Etil-acetatni ekstrakt, dobiven ekstrakcijom tekuće-tekuće, pročišćen je preparativnom tankoslojnom kromatografijom, čime su dobivene tri dominantne frakcije koje su karakterizirane IR spektroskopijom. Ukupni fenoli i flavonoidi određeni su spektrofotometrijskim metodama. S obzirom na provedena ispitivanja i dobivene rezultate, može se zaključiti kako je list masline značajan izvor fenolnih spojeva s mogućim biološkim potencijalom.

**Ključne riječi:** ekstrakcija, fenolni spojevi, IR spektroskopija, list masline, preparativna tankoslojna kromatografija

**Rad sadrži:** 30 stranica, 16 slika, 3 tablice, 21 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23,  
10 000 Zagreb**

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. *Senka Djaković*

**Pomoć pri izradi:**

**Datum obrane:** 8. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Nutrition**

**Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory of Organic Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition**

### **Isolation and characterization of phenolic compounds in olive leaf**

***Lea Čengić, 00582052038***

#### **Abstract:**

Olive (*Olea europaea* L.) is a small evergreen tree and a very old plant species which has been used since ancient times. It grows predominantly in the Mediterranean area and is used for many purposes as it has significant number of bioactive components that have potential positive effect on human health. In this bachelor thesis, an extraction, purification and characterization of phenolic compounds from the olive leaf were conducted. An ethyl-acetate extract, that was carried out using liquid-liquid extraction, was purified by preparative thin layer chromatography by which it was separated into three dominant fractions which were characterized using IR spectroscopy. Total phenols and flavonoids were determined by the spectrophotometric methods. Based on the conducted tests and results, it can be concluded that an olive leaf is a significant source of phenolic compounds that may have biological potential.

**Keywords:** extraction, phenolic compounds, IR spectroscopy, olive leaf, preparative thin layer chromatography

**Thesis contains:** 30 pages, 16 figures, 3 tables, 21 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD *Senka Djaković*, Associate Professor

**Technical support and assistance:**

**Defence date:** 8 September 2017

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Maslina.....	2
2.1.1. Kemijski sastav lista masline .....	3
2.2. Fenolni spojevi.....	4
2.2.1. Oleuropein .....	5
2.2.2. Flavonoidi .....	5
2.2.3. Supstituirani fenoli.....	7
2.3. Izolacija prirodnih spojeva .....	8
2.3.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva .....	8
2.3.2. Infracrvena spektroskopija .....	10
2.4. Uporaba i ljekovita svojstva .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>13</b>
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Ekstrakt lista masline .....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	13
3.2.2. Pročišćavanje etil-acetatnog ekstrakta .....	14
3.2.3. Infracrvena spektroskopija .....	17
3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola .....	17
3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>23</b>
4.1. Uvod .....	23
4.2. Izolacija fenolnih spojeva.....	23
4.3. Infracrvena spektroskopija.....	24
4.4. Koncentracija ukupnih fenola i flavonoida .....	27
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>28</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>29</b>

## 1. UVOD

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.

Maslina (*Olea europaea* L.) je malo zimzeleno drvo sporog rasta koje može živjeti i preko 1000 godina. U davninama, prije no što je postala kultivirana, je rasla kao divlja maslina (*Olea europaea oleaster*) na području Mediterana. I danas čini tipičnu mediteransku vegetaciju, a maslinovo ulje je glavna namirnica mediteranskog tipa prehrane. Iako su u prošlosti cijenjeni plod i drvo masline, upravo ulje je prepoznato kao njezin najvrjedniji proizvod zbog dokazanog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje [1]. Poznato je oko 60 domaćih i induciranih uzgajanih sorti, a po načinu uporabe plodova razlikuju se sorte za jelo i sorte za ulje i jelo. Najzastupljenije autohtone sorte su Oblica, Istarska bjelica, Lastovka, Levantinka i Žutica [2]. Zadnje otkriven, a također koristan dio masline, njezin list, danas je tema mnogih istraživanja. Sadrži znatne količine potencijalno korisnih fitokemikalija te se najčešće identificiraju i kvantificiraju bioaktivni fenoli [3]. Njihova osnovna podjela je na sekoiridoide, flavone, flavonole, flavan-3-ole i supstituirane fenole. Oleuropein, sekoiridoid koji je i dobio ime po maslini, je najzastupljeniji fenol u listu masline [4]. Fenoli, kao sekundarni biljni metaboliti, biljci služe za zaštitu od oštećenja i bolesti. Iz tog razloga proučava se njihova potencijalna zaštitna i antioksidativna aktivnost u organizmu čovjeka [5].

Cilj ovog završnog rada je provesti izolaciju bioaktivnih komponenata iz 50 %-tnog etanolnog ekstrakta biljnog materijala (*Olea europaea*), dobivenog primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE), pročistiti i karakterizirati dobivene frakcije te odrediti količinu ukupnih fenola i flavonoida u etil-acetatnom ekstraktu spektrofotometrijskim metodama.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Maslina

Maslina (*Olea europaea* L.) je vrlo stara biljna vrsta, a o njezinoj uporabi još u mlađem kamenom dobu svjedoče arheološki nalazi stari 9000 godina. Široko je rasprostranjena i uzgajana na području Mediterana, gdje se i nalaze najstariji primjerci, a stabla su primarno bila kultivirana u Palestini, Mezopotamiji i Siriji. Od davnina su prepoznati njezini ljekoviti i na organizam blagotvorni učinci; Hipokrat je maslinovo ulje koristio u liječenju raznih bolesti, Homer je ga je nazivao „tekućim zlatom“, a grčka mitologija nam govori kako je maslinu stvorila božica mudrosti Atena. U Republici Hrvatskoj uzgaja se na području primorja i smatra se kako je tu dospjela od starih Grka [2].

Drvo masline može narasti 8-15 metara visine, ovisno o uvjetima područja na kojem raste [1]. Samonikla maslina je grmolika, raste 4-5 metara visine, a lišće je tvrdo i kožasto te manje nego kod kultivirane masline. U našim krajevima deblo masline nije jako visoko te se krošnja počinje granati na 1-2 metara visine, dok je debljina debla u promjeru do 1 metar. Predstavnik masline na našem priobalju je Oblica.



*Slika 1.* Listovi i plodovi masline [1]

Maslina je dugovječno stablo, a upravo na našim prostorima se nalaze neki najdugovječniji primjerci. Jedna od najstarijih maslina na Sredozemlju nalazi se na Brijunima i stara je preko 1600 godina. Krošnja joj je široka 22, visoka 8 metara, stablo je visoko 6 metara, a prosječno daje 30 kg ploda. Maslina uspijeva u umjereno toplim krajevima, te se sukladno tome uglavnom uzgaja uz more. Osjetljiva je na nagle promjene vremena i na položaj. Preporučuje se saditi ju na prostorima zaklonjenima od jakog vjetro jer on lomi grane i skida plodove. Iako je drvo masline tvrdo, ono je i krhko te vrlo cijenjeno u tokarskom obrtu.

Dubina korijena masline ovisi o sastavu tla na kojem se uzgaja, udaljenosti stabala u masliniku i ovisno o tome je li stablo uzgojeno iz sjemena ili od izboja [2]. Cvjetovi su nježni, bijeložute boje, ugodnog mirisa [1]. Listovi masline su mali i kožasti, dugi 5-10 cm, široki 2 cm. Jednoliko su raspoređeni na grani; uvijek jedan nasuprot drugog, a grana završava jednim listom. Lice lista je svijetlozelene, dok je naličje bijele boje [2]. Plod masline je koštuničav, dugačak 2-2,5 cm, a boja mu varira od zelene, do crne kada je potpuno zreo. Koštica je okružena jestivim, mesnatim mezokarpom [1]. Dozrijevanjem ploda gubi se gorčina i povećava se sadržaj ulja [2].

Za razliku od danas, kada je najcjenjeniji proizvod masline njezino ulje, u davninama je prepoznata zbog neprerađenog ploda i drva, a tek onda ulja. Maslinovo ulje, iznimno cijenjeno zbog svojeg sastava i dokaza o pozitivnom utjecaju na ljudsko zdravlje, glavna je namirnica mediteranskog tipa prehrane [1].

U zadnje vrijeme naglasak je i na donedavno zanemarenom dijelu masline, koji se svrstavao kao otpad u proizvodnji, njezinom listu [3]. U narodnoj medicini upotrebljavao se kod sniženja temperature i liječenja nekih bolesti, poput malarije [5]. Istraživanjima je dokazano kako list masline sadrži znatne količine potencijalno korisnih fitokemikalija i može imati veliku ulogu u održavanju zdravlja čovjeka. Najčešće se identificiraju i kvantificiraju bioaktivni fenoli, odnosno njihova genotoksična, citotoksična i apoptotička svojstva [3].

### ***2.1.1. Kemijski sastav lista masline***

Lišće masline, dostupno tijekom cijele godine, nusproizvod je u maslinarstvu i gomila se prilikom obrezivanja stabala maslina [6]. Pojam list masline odnosi se na mješavinu lišća i grančica sakupljenih prilikom obrezivanja i čišćenja maslina [4]. Može se naći u velikim količinama u industriji proizvodnje maslinovog ulja jer se odvaja od ploda neposredno prije daljnje prerade. U listu se odvija biljni metabolizam kojim nastaju primarni ili sekundarni biljni metaboliti, a oni se kroz razna istraživanja promatraju kao potencijalne bioaktivne komponente [6].

Fenolni spojevi u listu masline čine mnogobrojnu grupu bioaktivnih komponenti, a grupirani su prema molekularnim karakteristikama u pet osnovnih skupina:



- sekoiridoidi (oleuropein, dimetiloleuropein, verbaskozid, ligstrozid)
- flavoni (luteolin, diosmetin, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid)
- flavonoli (rutin, kvercetin, kamferol)
- flavan-3-oli (katehin)
- supstituirani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina)

Sekoiridoid oleuropein je prisutan u najvećoj koncentraciji, a slijede ga hidroksitirozol, luteolin-7-glukozidi, apigenin-7-glukozidi i verbaskozidi (konjugirani glukozidi hidroksitirozola i kafeinske kiseline) [4]. Iako navedeni spojevi čine okosnicu kemijskog sastava lista masline, on može varirati ovisno o podrijetlu, udjelu grančica, uvjetima skladištenja, klimatskim uvjetima, sadržaju vlage, stupnju onečišćenja te primijenjenim procesima prerade (sušenje, ekstrakcija) [6]. Ukupni sadržaj polifenola i flavonoida lista masline procijenjen je na 2,058 mg GAE (engl. gallic acid equivalent) na 100 g i 858 mg CTE (engl. catechin equivalent) na 100 g, a vrijednosti su slične kao i kod crvenog grejpa [4].

## 2.2. Fenolni spojevi

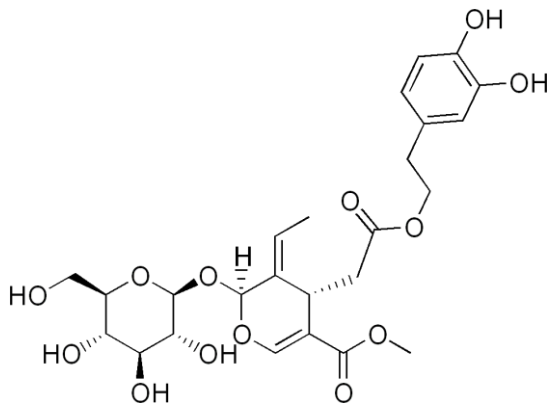
Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti i imaju važnu ulogu u sprječavanju stvaranja slobodnih radikala i bolesti u biljaka [5]. Kako maslina većinom raste i uzgajana je u mediteranskom području, koje karakterizira obilje sunčevog svjetla, ali i intenzivni napadi insekata, drvo masline sintetizira veliku količinu polifenola kako bi se obranilo od tih stresova [7]. Iz tog razloga detaljnije se proučava njihova antioksidativna aktivnost u svrhu zaštite ljudskog zdravlja [5].

U plodu i listu masline fenolni spojevi variraju količinom i vrstom, ovisno o razvoju i zrenju biljke. Jedan od glavnih fenolnih spojeva u nezrelim maslinama je sekoiridoid oleuropein [8]. Iako je maslinovo ulje najpoznatiji proizvod masline obilno korišten u mediteranskoj prehrani, list masline sadrži veću koncentraciju fenola. U maslinovom ulju nalazi se svega 0,005-0,12% fenola, dok je u listu ta vrijednost znatno veća i iznosi 1-14% [4].

Zbog svojih svojstava, fenolni spojevi lista masline mogu biti korišteni u medicini, farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji, u svrhu poboljšanja hrane te u razvoju funkcionalne hrane [6].

### **2.2.1. Oleuropein**

Oleuropein je heterozidni ester  $\beta$ -glikozilirane elenolske kiseline i 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozola) [8]. Pripada skupini sekoiridoida, sekundarnih metabolita terpena, koji čine oko 85% polifenola masline [9]. Sekoiridoidi su prekursori raznih indolnih alkaloida i najčešće su derivati glikozidnih oleozida, koje karakterizira kombinacija elenolske kiseline i glikozidnog ostatka. Fenolne komponente klasificirane kao sekoiridoidi su karakterizirane prisustvom elenolske kiseline ili njenih derivata.



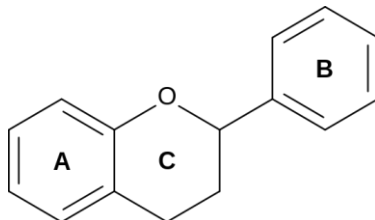
Slika 2. Struktura oleuropeina

Oleuropein i hidroksitirozol su prirodno prisutne fenolne komponente u plodu masline. Dok je oleuropein prisutan u većim količinama u izvornom plodu, hidroksitirozola je više u prerađenom plodu i maslinovom ulju [5]. Hidrolizom oleuropeina nastaju aglikon, elenolska kiselina, hidroksitirozol i molekula glukoze. Hidroksitirozol je fenolni alkohol i nakon oleuropeina čini najveći dio fenola lista masline [9]. Oleuropein je odgovoran za gorkost ploda, a istraživanjima je dokazano kako upravo on ima hipokolesterolemičnu i hipoglikemičku aktivnost te je potencijalan antioksidans s antiinflamatornim svojstvima [5,8].

### **2.2.2. Flavonoidi**

Flavonoidi čine najveću skupinu polifenolnih spojeva i imaju dokazanu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnosti. Vrlo dobro neutraliziraju slobodne radikale zbog čega imaju veliku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao antioksidansi i lijekovi. U biljkama djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti i zaštitu od UV zračenja, a smatra se kako su upravo oni najkorisnije fitokemikalije

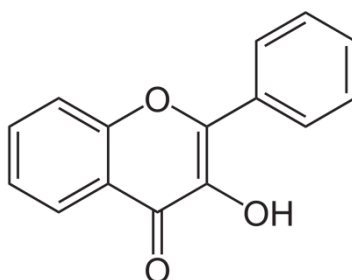
pronađene u hrani. Kroz mnogobrojna istraživanja pokazalo se kako mogu imati povoljna svojstva i za čovjeka; antibakterijsko, sedativno, antimutageno, antialergijsko, antivirusno i druga [10]. To se može pripisati strukturi flavonoida koju čine dva aromatska prstena (A i B prsteni) povezana 3-karbonskim lancem kojeg formira oksigenirani heterociklički C prsten.



*Slika 3.* Osnovna struktura flavonoida

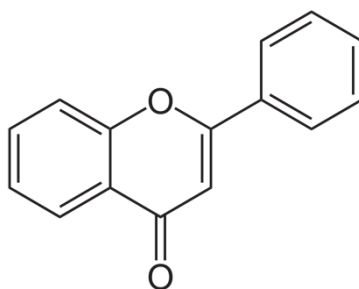
Razlike u generičkoj strukturi heterocikličnog C prstena, kao i oksidacijsko stanje i funkcionalne grupe, klasificiraju flavonoide kao flavonole, flavone, flavanone, flavan-3-ole (flavane) i antocijane.

Flavonoli su najrašireniji flavonoidi u hrani, a najistaknutiji su kamferol i kvercetin. Općenito su prisutni u relativno malim koncentracijama (15-30 mmg/kg svježe mase), a najbogatiji izvori flavonola su luk, kelj, brokula, jabuke i borovnice. Znatnu količinu mogu sadržavati i crveno vino te čaj.



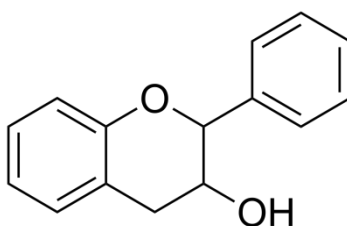
*Slika 4.* Struktura flavonola

Flavoni su mnogo manje zastupljeni u voću i povrću, a najistaknutiji su apigenin i luteolin. Nalaze se u peršinu i celeru.



Slika 5. Struktura flavona

Flavan-3-oli su prisutni u mnogim vrstama voća, čaju, kakau i čokoladi. Mogu biti monomeri (epikatehin i katehin) ili oligomeri (proantocijanidini).



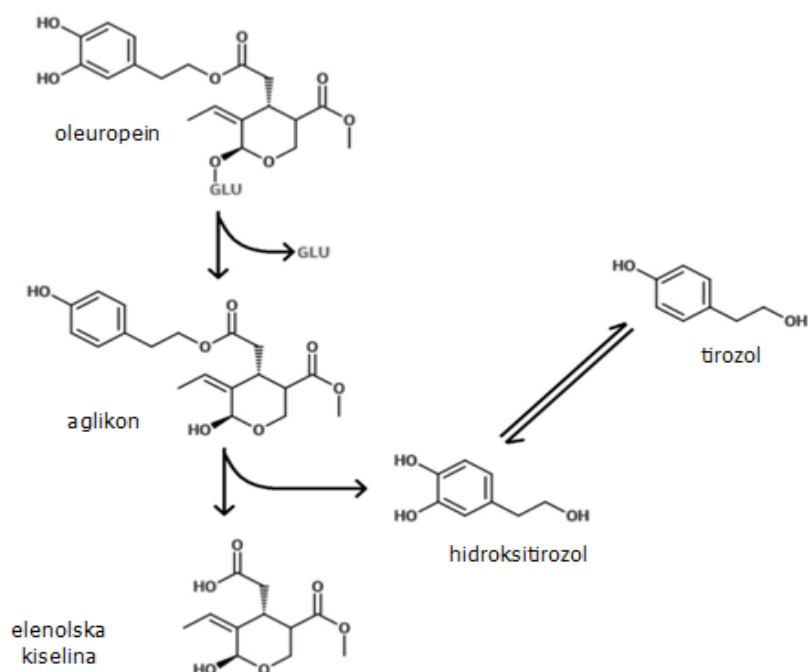
Slika 6. Struktura flavan-3-ola

Polimeri, odnosno kondenzirani tanini, su odgovorni za adstringentnost nekih vrsta voća i njihovih proizvoda [11].

Prethodno navedeni i opisani su najzastupljeniji flavonoidi i u listu masline [4]. Konkretno se radi o spojevima apigenin-7-O-glukozid i -7-O-rutinozid, luteolin-7-O-glukozid, -7-O-rutinozid i 4'-O-glukozid, rutin, luteolin, apigenin te diosmetin [12].

### **2.2.3. Supstituirani fenoli**

Tirozol (4-hidroksifenetil alkohol) i hidroksitirozol (2-(3,4-dihidroksifenil)etanol) su najbitniji supstituirani fenoli masline. Njihov pozitivan utjecaj na zdravlje je neupitan; povećavaju koncentraciju HDL kolesterola, reduciraju oksidativna oštećenja lipida, inhibiraju inflamaciju, poboljšavaju endotelnu funkciju, smanjuju sistolički krvni tlak, smanjuju rast tumorskih stanica, štite centralne živce. Ipak, ne koriste se kao prehrambeni suplementi ili aditivi jer imaju hidrofilan karakter, zbog čega je otežana ekstrakcija iz vodenog medija i topljivost u lipidnom mediju [13]. Hidroksitirozol je produkt hidrolize oleuropeina u *in vivo* sustavima [14].



Slika 7. Hidroliza oleuropeina i nastanak hidroksitirozola, odnosno tirozola

### 2.3. Izolacija prirodnih spojeva

Izolacija je postupak pročišćavanja produkata iz reakcijske smjese, odnosno izdvajanje prirodnog spoja iz prirodnog materijala. Svrha je dobivanje željenog čistog spoja. Prije no što je postojala mogućnost njihove sinteze, prirodni spojevi iz biljnih i životinjskih materijala mogli su se dobiti jedino izolacijom. Budući da je njihova uporaba vrlo značajna, najčešće su izolirane ljekovite tvari, bojila i mirisi. Danas, kada su sintetski tehnološki postupci skoro pa usavršeni, mnogi od tih spojeva mogu se tako dobiti, ali neke spojeve moguće je još uvijek dobiti jedino uporabom izolacije. Iz tog razloga izolacija se smatra vrlo vrijednim postupkom u procesu dobivanja životno bitnih prirodnih spojeva [15].

#### 2.3.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija je prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo koje se ne miješa s tom fazom, odnosno, željena tvar mora biti topljivija u tom otapalu u odnosu na polaznu fazu [15]. Ekstrakcija bioaktivnih komponenata iz biljnih materijala prvi je korak kod pripreme fitokemikalija za proizvodnju suplemenata, nutraceutika, sastojaka hrane, farmaceutika te kozmetičkih preparata. Sukladno tome, veliku ulogu u proizvodnji visokokvalitetnih biljnih produkata ima razvoj i modernizacija tehnika za pripremu uzoraka.

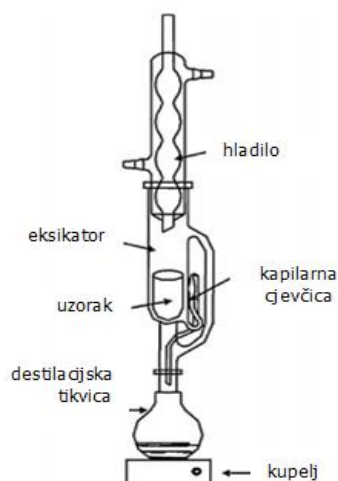
Budući da njihova polarnost značajno varira, još uvijek nije razvijena idealna tehnika za ekstrakciju svih fenolnih komponenti. Prilikom istraživanja provedenih na listu masline, najčešće korištena otapala za ekstrakciju fenola su voda, etanol, metanol, aceton, kao i alkoholne mješavine.

Neke od novijih tehnika upotrebljivanih u nedavnim istraživanjima su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. ultrasound assisted extraction, UAE), ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. supercritical fluid extraction, SFE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. microwave assisted extraction, MAE), ubrzana ekstrakcija otapalima (engl. accelerated solvent extraction, ASE) te ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (engl. high pressure assisted extraction, HPAE). Bitne prednosti tih novih tehnika su smanjenje volumena otapala te poboljšana efikasnost same ekstrakcije. Ovisno o cilju istraživanja, vrši se optimizacija modernih tehnika ekstrakcije.

Ultrazvučna radijacija pomoć je kod ubrzanja različitih koraka analitičkih procesa. Ultrazvuk poboljšava proces ekstrakcije te omogućava razvoj novih komercijalnih tipova ekstrakcije. Ubrzana ekstrakcija otapalima koristi organska otapala pri visokim tlakovima i temperaturama iznad njihove uobičajene točke vrenja kako bi se postigla brza i efikasna ekstrakcija analita iz krutog uzorka. U razvoju metoda ekstrakcije polifenola iz lista masline korištena je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Veliki je interes za ekstrakcijom superkritičnim fluidima jer oni osiguravaju visoku topljivost i poboljšanu stopu prijenosa mase, a osim toga i manipulaciju procesa promjenama temperature ili tlaka [6].

Vrlo često korišten sustav ekstrakcije je Soxhlet, nastao 1879. godine kada je Franz von Soxhlet razvio novi tip ekstraktora. I danas se prednosti Soxhlet ekstrakcije upotrebljavaju prilikom razvoja novih sustava [16]. Princip metode zasniva se na višestrukoj kontinuiranoj ekstrakciji u specijalnoj aparaturi s odgovarajućim otapalom, nakon čega se otapalo otpari, a ostatak suši, hladi i važe.

Uzorak, koji se nalazi u papirnoj čahuri sa slojem suhe odmašćene vate, stavlja se u eksikator (srednji dio Soxhletove aparature). Eksikator se zatim postepeno, preko hladila puni otapalom korištenim za ekstrakciju, a pomoću kapilarne cjevčice se isprazni u tikvicu. Nakon toga dodaje se volumen otapala kojim se napuni polovica eksikatora. Kroz hladilo se pušta mlaz hladne vode i počne se sa zagrijavanjem destilacijske tikvice u vodenoj ili pješčanoj kupelji. Ekstrakcija traje do trenutka kada se otapalo iz eksikatora prelije u tikvicu, a čahura s uzorkom u eksikatoru bude bez otapala.



Slika 8. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu [16]

Ekstrakcija traje najčešće nekoliko sati, a ovisi o vrsti uzorka i otapala, veličini površine koja je u kontaktu s otapalom te brzini cirkulacije samog otapala [17].

### 2.3.2. Infracrvena spektroskopija

Energija koja izaziva molekulske vibracije odgovara zračenju u infracrvenom području. Uzorak izložen infracrvenom zračenju, uz kontinuiranu promjenu valne duljine, apsorbira u spektrometru upadno zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskim vibracijama. Spektrometar obuhvaća područja apsorpcije koja su u vezi s deformacijom i rastezanjem veza u molekuli. Bilježenjem apsorpcije zračenja dobivamo infracrveni spektar. Suvremeni instrumenti bilježe apsorpciju energije u ovisnosti o opadajućoj frekvenciji slijeva udesno. Kao jedinica se upotrebljava valni broj ( $\text{cm}^{-1}$ ), a bilježi se i valna duljina ( $\mu\text{m}$ ).

Energije rasteznih vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između  $4000$  i  $1200 \text{ cm}^{-1}$ . Taj dio spektra koristi se za određivanje funkcionalnih skupina organskih spojeva te se naziva područje funkcionalnih skupina, zato što su položaj i karakteristike apsorpcijskih vrpce većine funkcionalnih organskih spojeva pri tim valnim duljinama razmjerno nepromjenjive.

Značajan broj vrpce sadržan je u području frekvencije IR spektra ispod  $1600 \text{ cm}^{-1}$ . Tu se nalaze brojne vrpce koje odgovaraju deformacijskim vibracijama molekule, kao i nekim složenim vibracijama i vibracijama gornjeg tona. Prisutne su i karakteristične rastezne vibracije pojedinih veza. Oblik koji ocrtavaju sve vrpce zajedno specifičan je za određeni spoj, pa se taj dio spektra zove područje „otiska prsta“.

Uglavnom svi organski spojevi imaju neke IR apsorpcijske vrpce između 3300 i 2800  $\text{cm}^{-1}$ , budući da je to područje svojstveno za rastezne frekvencije veze C-H. Rastezne vibracije hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske vrpce u području od 3600 do 3200  $\text{cm}^{-1}$ , a ako je hidroksilna skupina dio karboksilne kiseline javlja se kao vrlo široka vrpca u području od 3600 do 2500  $\text{cm}^{-1}$ . Ta vrpca s rasteznom frekvencijom karbonila pri 1710  $\text{cm}^{-1}$  karakterizira karboksilne kiseline. Aromatski spojevi obično daju niz vrpca između 1600 i 1400  $\text{cm}^{-1}$ , a vrpce u području od 900 do 700  $\text{cm}^{-1}$  se često primjenjuju za utvrđivanje načina supstitucije na aromatskom prstenu [18].

Bitna prednost IR spektroskopije kod primjene na hranu jest to što jednom kada je instrument kalibriran, nekoliko dijelova uzorka može se mjeriti istovremeno i velikom brzinom te se ne zahtijeva manipulacija uzorka. Prehrambena industrija upravo zato vrlo često koristi IR spektroskopiju prilikom analize hrane [19].

#### **2.4. Uporaba i ljekovita svojstva lista masline**

Maslina je kao ljekovita biljka spomenuta još u Bibliji [9]. Iako su plod i drvo masline njezini najkorišteniji dijelovi od davnina, postoje dokazi o uporabi lista masline još u drevnom Egiptu, gdje se on smatrao simbolom nebeske moći. Ekstrahirana ulja lista masline tako su se koristila prilikom mumifikacije egipatskih kraljeva. Potkraj 19. stoljeća prvi put je izoliran predstavnik fenolnih spojeva lista masline, oleuropein. Smatralo se kako je upravo on odgovoran za mnogobrojna ljekovita svojstva lista masline, a 1962. godine potvrđeno je kako djeluje na snižavanje krvnog tlaka kod životinja. Nakon tog otkrića, zainteresiranost za spojeve lista masline dodatno je porasla.

Sljedeće su bile spoznaje kako on pozitivno utječe na cirkulaciju krvi, ublažava aritmiju i smanjuje pojavu grčeva crijevnih mišića. Naknadno je izoliran i aktivni sastojak oleuropeina, elenolska kiselina. List masline korišten je u medicinske svrhe posebice na području Mediterana, a njime se liječe infekcije, groznica i bolovi [20]. Bioaktivna svojstva lista masline omogućuju antioksidativno, antiinflamatorno, antihipertenzijsko, antiaterogeno, hipoglikemijsko i hipokolesterolemično djelovanje. List masline sadrži slične fenolne spojeve kao i plod, ali u mnogo većoj koncentraciji, a upravo to je razlog njegovog blagotvornog djelovanja na zdravlje [9]. Flavonoidi i oleuropein imaju važnu antioksidativnu aktivnost prema slobodnim radikalima nastalim metaboličkim procesima u stanicima.



Njihove fenolne hidroksilne grupe sudjeluju u redoks reakcijama, a na antioksidativnu aktivnost utječe i kemijska struktura spoja [7].

Prilikom proizvodnje ekstra djevičanskog maslinovog ulja, lišće može nenamjerno dospjeti u smjesu ako separacijski procesi nisu bili adekvatni, ali može se dodati i namjerno kako bi se povećao povoljan utjecaj na zdravlje i dobio bolji okus. Dodatak lišća povećava sadržaj fenola i klorofila u ulju te se dobiva drugačiji okus, pozitivno ocijenjen od strane kušača [9]. Zahvaljujući bogatim udjelom antioksidanasa, odnosno polifenola, dodatak 2%-3% listova u prezrele masline prije prerade utječe na stvaranje ulja s bogatijim okusom i većom oksidativnom stabilnošću [6].

Postoji nekoliko flavonoida koje sadrži ekstrakt lista masline, a nisu zabilježeni u ulju ploda. Neki od njih su apigenin i luteolin, za koje se smatra kako imaju antikancerogena svojstva. Također, razlikuje se i struktura fenola ploda i lista. Tako su fenoli ekstrakta lista masline glikozilirani u većoj mjeri, a smatra se kako imaju bolju biodostupnost i bioiskoristivost upravo zbog prisutnosti glukoze. U nekim istraživanjima je mogućnost polifenola ekstrakta lista masline da inhibiraju proliferaciju tumorskih stanica gušterače i dojke. Također, moguć je povoljan utjecaj i na leukemiju. Vrlo bitno svojstvo oleuropeina i hidroksitirozola je to da razlikuju tumorske stanice od normalnih, odnosno inhibiraju proliferaciju i induciraju apoptozu samo tumorskih stanica [9].

Zabilježeno je kako je antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline viši u odnosu na vitamine C i E ili čisti hidroksitirozol, koji su sami vrlo jaki antioksidansi. Odnedavno se ekstrakt lista masline može naći i kao prehrambeni proizvod u obliku sušenog lišća, praška, ekstrakta ili kapsula. Zadnjih godina nutraceutici se smatraju sastojkom hrane koja promovira zdravlje, a inkapsulacija je proces koji sprječava degradacijske i oksidacijske reakcije u takvim pripravcima. Inkapsulacija ekstrakta lista masline u  $\beta$ -ciklodekstrin povećava topljivost polifenolnih ostataka iz lista masline u vodenom mediju za više od 150% i može se koristiti kao prehrambeni aditiv [6].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Ekstrakt lista masline

S ciljem izolacije i karakterizacije fenolnih spojeva prisutnih u listu masline (*Olea europaea*) koristio se 50%-tni etanolni ekstrakt lista masline sorte Oblica dobiven primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE). Listovi masline su sakupljeni na području Republike Hrvatske, osušeni, zatim samljeveni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita CG1, Italy) u prah, a dobiveni prah je korišten za ekstrakciju fenolnih spojeva.



Slika 9. Suhi 50%-tni etanolni ekstrakt lista masline

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće, odnosno ekstrakcija organskim otapalom je proces kada se otopljena tvar raspodjeljuje između dviju faza koje se ne miješaju. Prenosjenje tvari iz jedne faze u drugu naziva se razdjeljenje. Kemijski spoj se razdjeljuje s obzirom na relativnu topljivost u pojedinoj fazi i postiže ravnotežu jer je nakon razdvajanja otapala na dva sloja omjer koncentracija u otapalima stalan bez obzira na volumene otapala i količinu otopljene tvari. W. H. Nernst tu je pojavu izrazio formulom koja je poznata kao Nernstov zakon razdjeljenja:  $K=c_1/c_2$ , pri čemu su  $c_1$  i  $c_2$  ravnotežne koncentracije, a konstanta  $K$  koeficijent razdjeljenja.

Ekstrakcija je izvršena uporabom smjese etil-acetat/voda. U lijevak za odjeljivanje ulije se ekstrakt lista masline i otapalo u koje se tvari ekstrahiraju, u ovom slučaju etil-acetat. Potom se lijevak intenzivno protrese i ostavi da se slojevi razdijele. Prilikom izmućkivanja u lijevku nastaje pretlak koji se mora izjednačiti s vanjskim tlakom otvaranjem pipca. Može doći do pojave emulzije, a tada se dodaje amil-alkohol ili se vodena faza zasićuje natrijevim kloridom. Slojevi se odvajaju temeljem različitih gustoća, pa je u ovom slučaju gornji sloj bio manje gustoće, etil-acetatni, a donji vodeni. Zaostala voda u etil-acetatnom sloju uklanja se sredstvom za sušenje, odnosno bezvodnim natrijevim sulfatom. Bistra otopina se potom otparuje u rotacijskom otparivaču ili rotavaporu te se dobije suhi etil-acetatni ekstrakt. Dobiveno je 1,36 g uzorka iz vodenog sloja (ekstrakt **1**), tamnosmeđe boje i 1,09 g žuto-zelene krutine iz etil-acetatnog sloja (ekstrakt **2**).

### ***3.2.2. Pročišćavanje etil-acetatnog ekstrakta***

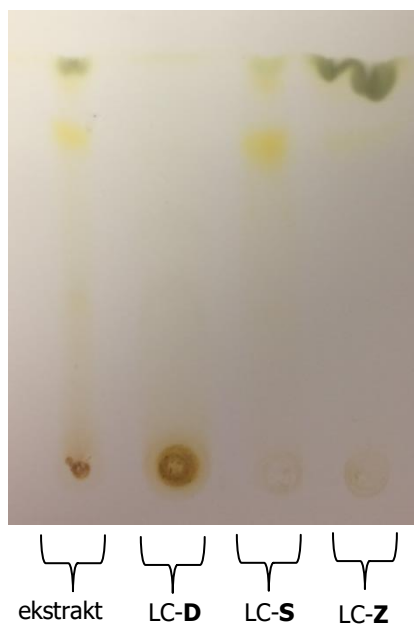
Fenolni spojevi iz etil-acetatnog ekstrakta lista masline pročišćeni su pomoću preparativne tankoslojne kromatografije, a karakterizirani su IR spektroskopijom. Prije pročišćavanja sirovog produkta (etil-acetatni ekstrakt) preparativnom tankoslojnom kromatografijom, potrebno je pronaći eluens koji će uspješno razdvojiti sastojke smjese. Etil-acetat se pokazao kao dobar eluens u postupku tankoslojne kromatografije te je korišten u daljnjem postupku pročišćavanja.

#### *Tankoslojna kromatografija*

Općenito, kromatografija je tehnika kojom se odjeljuju sastojci smjese, ovisno o brzinama kojima ih tekuća ili plinovita mobilna faza nosi kroz stacionarnu fazu. Tankoslojnom kromatografijom (TLC) sastojci smjese odjeljuju se na temelju njihove različitosti u topljivosti u dvofaznom sustavu. Stacionarnu fazu najčešće čini tanki sloj silikagela ili aluminijevog oksida na pločici od stakla, metala ili plastike, dok mobilna faza može biti jedna tekućina ili tekućina pomiješana s otapalom koja se polako diže kapilarnim silama po stacionarnoj fazi. Uzorci se nanose na dno TLC pločice, zatim se ona uranja u kadnicu u kojoj se nalazi tekućina mobilne faze te se prati razvoj kromatograma. Kada putujuća mrlja dosegne određenu točku udaljenosti od startne linije, to znači da su uspostavljene interakcije između sastojaka smjese ekstrakta, stacionarne faze i otapala. Bitan je odabir pravilnog eluensa kako bi se sastojci smjese pravilno razdijelili. Nakon što se sastojci smjese razdijele, računa se retencijski faktor svake pojedine mrlje, odnosno omjer udaljenosti koju je prošla mrlja i udaljenosti do koje je stigla fronta otapala. Dobivena vrijednost predstavlja osnovni kriterij za identifikaciju

pojedinih spoja. Tankoslojna kromatografija ima brojne prednosti, poput jednostavne pripreme, visoke osjetljivosti, malo potrebne opreme i vremenski brze izvedbe.

Tvar se otopi u minimalnoj količini etil-acetata te se kapilarom nanese na startnu liniju koja je udaljena 1,5-2 cm od ruba pločice i osuši. Pločica se stavi u kadu u kojoj se nalazi etil-acetat (mobilna faza) koji se zbog kapilarnih sila diže uz pločicu i eluira sastojke smjese.

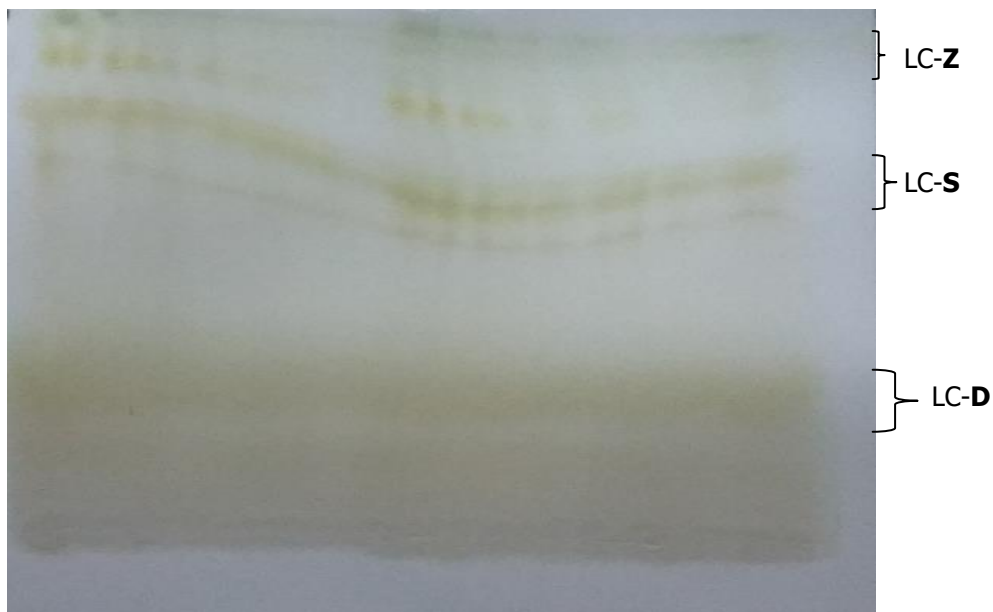


*Slika 10.* Tankoslojna kromatografija ekstrakta i pojedinačnih frakcija

Dobiveni kromatogram (slika 10.) sadrži četiri linije; prva linija predstavljala je sami ekstrakt, dok su ostale tri činile svaku frakciju dobivenu preparativnom tankoslojnom kromatografijom zasebno.

#### *Preparativna tankoslojna kromatografija*

Preparativnom tankoslojnom kromatografijom pročišćava se smjesa fenolnih spojeva iz uzorka, odnosno uparenog ekstrakta. Uzorak se nanese na staklene ploče (20x20 cm) presvučene slojem silikagela, 1-2 cm od donjeg ruba ploče. Na ploču se nanese maksimalno 100 mg uzorka nakon čega se ona uroni u pogodan eluens i razvija se kromatogram sve dok fronta otapala ne bude 1-2 cm od gornjeg ruba ploče. U ovom postupku pročišćavanja kao eluens korišten je etil-acetat.



*Slika 11.* Preparativna tankoslojna kromatografija ekstrakta lista masline

Nakon razvijanja kromatograma (slika 11.), ploča se osuši te se svaka pojedina frakcija skine s ploče i prenese u zasebne tikvice. Iz ovog kromatograma dobivene su tri frakcije; donja dominantna žućkasto-smeđa (LC-D), srednja u kojoj se nalazi više različitih spojeva (LC-S) te gornja, čiste zelene boje (LC-Z).

Linija	Boja	Masa (mg)	R <sub>f</sub>
<b>1 (ekstrakt)</b>	smeđe-žuto-zelena		
<b>2 (LC-D)</b>	žuto-smeđa	39,5	0
<b>3 (LC-S)</b>	žuta	76	0,7727
<b>4 (LC-Z)</b>	zelena	23,9	1

*Tablica 1.* Frakcije dobivene tankoslojnom kromatografijom

Vidljivo je koju poziciju zauzima koja frakcija iz smjese u ekstraktu te su izračunate vrijednosti retencijskog faktora za svaku.

### **3.2.3. Infracrvena spektroskopija**

IR spektri dobivenih frakcija snimljeni su kao diklormetanske otopine ili KBr pastile na ALPHA-Transmittance FTIR spektrofotometru (Bruker, Njemačka).

*Upareni vodeni ekstrakt:*

IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3340 (š. j., O–H), 2934, (sr., C–H), 2879 (sr., C=C), 1700 (j., C=O), 1603 (j., C=C), 1382 (sl., CH<sub>2</sub>), 1079 i 1026 (sr., C–O, C–C).

*Upareni etil-acetatni ekstrakt prije pročišćavanja:*

IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3381 (š. j., O–H), 2928 (sr., C–H), 2859 (sr., C=C), 1709 (j., C=O), 1630, 1517 (sl., C=C), 1444, 1369 (sl., CH<sub>2</sub>), 1266 (sr., C–OH), 1192, 1075 i 1035 (sr., C–O, C–C).

*IR spektri frakcija dobivenih nakon pročišćavanja etil-acetatnog sloja:*

Frakcija **D**: IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3506 (sr. j., OH), 3295 (š. sl., O–H), 2921 (sr., C–H), 2855 (sr., C=C), 1705 (j., C=O), 1657, (sr., C=O), 1602 (sl., C=C), 1465, (sl., CH<sub>2</sub>), 1379 (sr., C–OH), 1127, 1075 (sr., C–O, C–C).

Frakcija **S**: IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3310 (š. sl., O–H), 2939 (sr., C–H), 2868 (sr., C=C), 1693 (j., C=O), 1462, 1370 (sl., CH<sub>2</sub>), 1274 (sr., C–OH), 1127, 1075 (sr., C–O, C–C).

Frakcija **Z**: IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 2925 (sr., C–H), 2855 (sr., C=C), 1743 (j., C=O), 1552 (sl., C=C), 1461, 1369 (sl., CH<sub>2</sub>), 1258 (sr., C–OH), 1162, 1105, 1065 (sr., C–O, C–C).

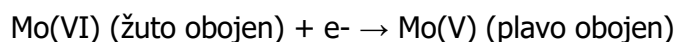
*Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:*

IR spektri:  $\nu$  = rastezanje (stretching), j. = jaka vrpca, sr. = srednja vrpca, š. = široka vrpca, sl. = slaba vrpca.

### **3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola**

Fenoli se iz biljnih ekstrakata mogu odrediti raznim metodama, od kojih su najkorištenije kromatografske i spektrofotometrijske. U ovome radu za određivanje koncentracije ukupnih fenola iz ekstrakta lista masline primijenjena je spektrofotometrijska metoda s Folin-Ciocalteu reagensom. Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva u blago lužnatim uvjetima, prilikom čega se fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina Folin-Ciocalteu reagensa reduciraju do molibdenovog i volframovog oksida koji daju plavo obojenje.

*Reakcije su sljedeće:*



Što je plavo obojenje intenzivnije, prisutan je veći broj hidroksilnih, odnosno oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrom pri valnoj duljini 760 nm.

*Priprema otopina:*

Standard galne kiseline priredi se otapanjem 0,5 g galne kiseline u 10 mL 96%-tnog etanola, a potom se nadopuni destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL.

0,2 M Folin-Ciocalteu reagens priredi se dodatkom 2,5 mL 2 M FC u 25 mL destilirane vode.

20%-tni natrijev karbonat priredi se otapanjem 200 g bezvodnog natrijevog karbonata u 800 mL ključale destilirane vode, zatim se nakon hlađenja doda nekoliko kristalića bezvodnog natrijevog karbonata, tikvica od 1000 mL se dopuni do oznake destiliranom vodom i filtrira se nakon 24 h.

*Priprema uzorka:*

Upareni etil-acetatni ekstrakt lista masline otopi se u etanolu i razrijedi 5x kako bi se mogla odrediti koncentracija ukupnih fenola. Za razrjeđenje je korištena 50%-tna vodena otopina etanola.

*Postupak određivanja:*

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 1 mL uzorka ili slijepe probe, 10 mL destilirane vode i 1,25 mL 0,2 M Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 5 minuta dodaje se 3,75 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata i odmjerna tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Tako priređene odmjerne tikvice čuvaju se 2 h na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi ili se termostatiraju na 50°C 30 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija, odnosno optička gustoća otopine pri valnoj duljini 760 nm.

*Izrada baždarnog pravca:*

Od ranije pripremljenog standarda galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL. Otpipetira se 0, 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 3,0 i 3,6 mL alikvota standarda galne kiseline u svaku tikvicu, a potom se svaka dopuni destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 0, 10, 30, 50, 100, 150 i 180 mg/L.

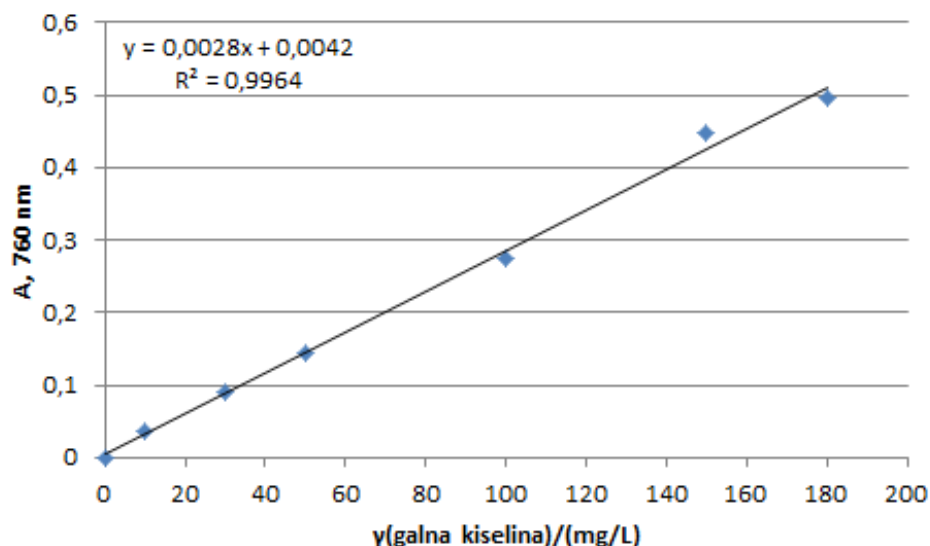


*Slika 12.* Razrjeđenja standarda galne kiseline

Zatim se otpipetira 1 mL svakog pojedinog razrjeđenja, dodaje se 10 mL destilirane vode i 1,25 mL 0,2 M Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 5 minuta dodaje se 3,75 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata i odmjerna tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Kao i kod pripreme uzorka, tikvice se čuvaju 2 h na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi ili se termostatiraju na 50°C 30 minuta. Apsorbancija se također mjeri pri valnoj duljini 760 nm. Baždarni pravac napravi se u Microsoft Excel programu iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i sadrži 7 točaka, od kojih je prva slijepa proba, a ostalih 6 odnose se na svaku pojedinu tikvicu razrjeđenja standarda galne kiseline. Na osi apscisa prikazane su koncentracije galne kiseline u mg/L, a na osi ordinata izmjerene vrijednosti apsorbancija svake pojedine tikvice razrjeđenja pri valnoj duljini 760 nm.



$\gamma$ (mg/L)	A, 760 nm
10	0,035
30	0,091
50	0,1445
100	0,275
150	0,448
180	0,4955



Tablica 2./Slika 13. Ovisnost masene koncentracije o apsorbanciji galne kiseline

Jednadžba pravca vidljiva je iz slike;  $y = 0,0028x + 0,0042$

y – apsorbancija pri valnoj duljini 760 nm

x – koncentracija galne kiseline u mg/L

Mjerenje apsorbancije uzorka, odnosno ekstrakta lista masline, provedeno je u dvije paralele. Apsorbancija u ekstraktima je iznosila 0,348 i 0,346, što daje srednju vrijednost apsorbancije od 0,347.

Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca i izražena je u mg GAE/g uzorka lista masline. GAE označava kraticu za ekvivalent galne kiseline (engl. gallic acid equivalent). Za ukupne fenole dobivena je vrijednost 30,98 mg GAE/g

### **3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida**

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva te imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Temelj određivanja flavonoida je njihovo svojstvo da reakcijom s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom tvore obojeni kompleks. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida i mjeri se pri valnoj duljini 415 nm.

#### *Priprema uzorka:*

Kao i za određivanje koncentracije ukupnih fenola, korišten je upareni etil-acetatni ekstrakt lista masline, otopljen u etanolu, koji je razrijeđen 5x otapalom, odnosno 50%-tnom vodenom otopinom etanola.

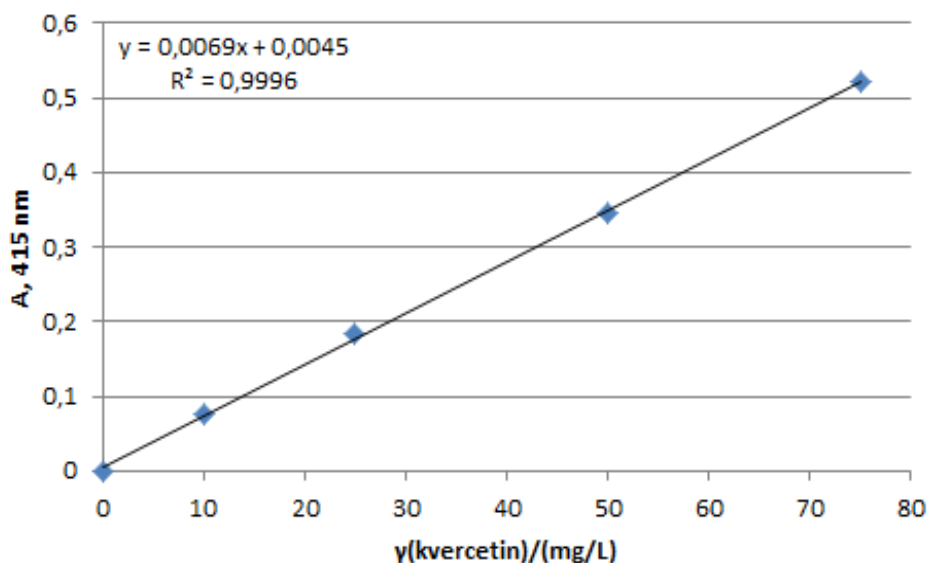
#### *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 1 mL uzorka (200  $\mu$ L ekstrakta i 800  $\mu$ L 50%-tne vodene otopine etanola), 3 mL 96%-tnog etanola, 0,2 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,2 mL 1 M kalijevog acetata i 5,6 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 (0,2 mL). Reakcijska smjesa zatim stoji 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 415 nm.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Pripremi se otopina standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L, a od nje se pripreme razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL. Redom se 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. Iz svake pojedine tikvice otpipetira se 0,5 mL razrjeđenja, dodaje se 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 pripremu slijepa probe umjesto razrjeđenja standarda kvercetina uzima se 100%-tni metanol, a umjesto 10%-tnog aluminijevog klorida dodaje se isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Tikvice reakcijskih smjesa potom stoje 30 minuta, nakon čega se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac u programu Microsoft Excel, pri čemu su na osi apscisa prikazane koncentracije kvercetina (mg/L), a na osi ordinata izmjerene vrijednosti apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm.

$\gamma$ (mg/L)	A, 415 nm
10	0,0752
25	0,1835
50	0,3457
75	0,522



Tablica 3./Slika 14. Ovisnost masene koncentracije o apsorbanciji kvercetina

Jednadžba pravca vidljiva je iz slike;  $y = 0,0069x + 0,0045$

y – apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm

x – koncentracija kvercetina u mg/L

Mjerenje apsorbancije uzorka, odnosno ekstrakta lista masline, provedeno je u dvije paralele. Apsorbancija u ekstraktima iznosila je 0,198 i 0,196, što daje srednju vrijednost apsorbancije od 0,197.

Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca. Maseni udjeli ukupnih flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg QE g<sup>-1</sup>. Za ukupne flavonoide dobivena je vrijednost 7,13 mg QE/g.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Cilj ovog završnog rada je provesti izolaciju bioaktivnih komponenata iz 50 %-tnog etanolnog ekstrakta iz lista masline sorte *Oblica*, dobivenog primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE), pročistiti i karakterizirati dobivene frakcije te odrediti količinu ukupnih fenola i flavonoida u etil-acetatnom ekstraktu spektrofotometrijskim metodama.

Prvi dio završnog rada odnosi se na izolaciju fenolnih spojeva iz lista masline ekstrakcijom tekuće-tekuće s etil-acetatom kao otapalom. Drugi dio rada posvećen je pročišćavanju dobivene smjese fenolnih spojeva preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz pogodni eluens te karakterizaciji pojedinih frakcija IR spektroskopijom. U trećem dijelu rada određena je masena koncentracija ukupnih fenola i flavonoida u etil-acetatnom ekstraktu.

### 4.2. Izolacija fenolnih spojeva

List masline bogat je izvor sekundarnih biljnih metabolita, posebice sekoiridoida, flavona, flavonola, flavan-3-ola i supstituiranih fenola. Od sekoiridoida značajno se ističe oleuropein, od flavona luteolin, diosmetin, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid te diosmetin-7-glukozid, od flavonola rutin, kvercetin i kamferol, od flavan-3-ola katehin te od supstituiranih fenola tirozol, hidrokstirozol, vanilin, vanilinska kiselina te kafeinska kiselina [4]. Varijabilnost u koncentracijama tih spojeva uvjetovana je podrijetlom, udjelom grančica, uvjetima skladištenja, klimatskim uvjetima, sadržajem vlage, stupnjem onečišćenja te primijenjenim procesima prerade [6].

Za izolaciju fenolnih spojeva u ovom radu korišten je upareni 50%-tni etanolni ekstrakt lista masline tamnosmeđe boje. Kako bi se razdvojile fenolne komponente na temelju njihove polarnosti, provedena je ekstrakcija s etil-acetatom kao otapalom, nakon čega je izdvojeni etil-acetatni ekstrakt uparen u rotavaporu i masa osušenog zlaćano zelenkastog ekstrakta iznosila je 1,09 g, dok je masa uzorka iz vodenog sloja iznosila 1,36 g. Tankoslojnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens dobivene su frakcije na pločici presvučenoj silikagelom. Izdvojene su tri različito obojene komponente: žuto-smeđa ( $R_f=0$ ), žuta ( $R_f=0,7727$ ) i zelena ( $R_f=1$ ). Ovim postupkom izolacije dobivena je smjesa fenolnih spojeva. Kako bi se izvršila karakterizacija pojedinih komponenata u dobivenom ekstraktu, potrebno je provesti postupak pročišćavanja. U tu svrhu korištena je preparativna tankoslojna

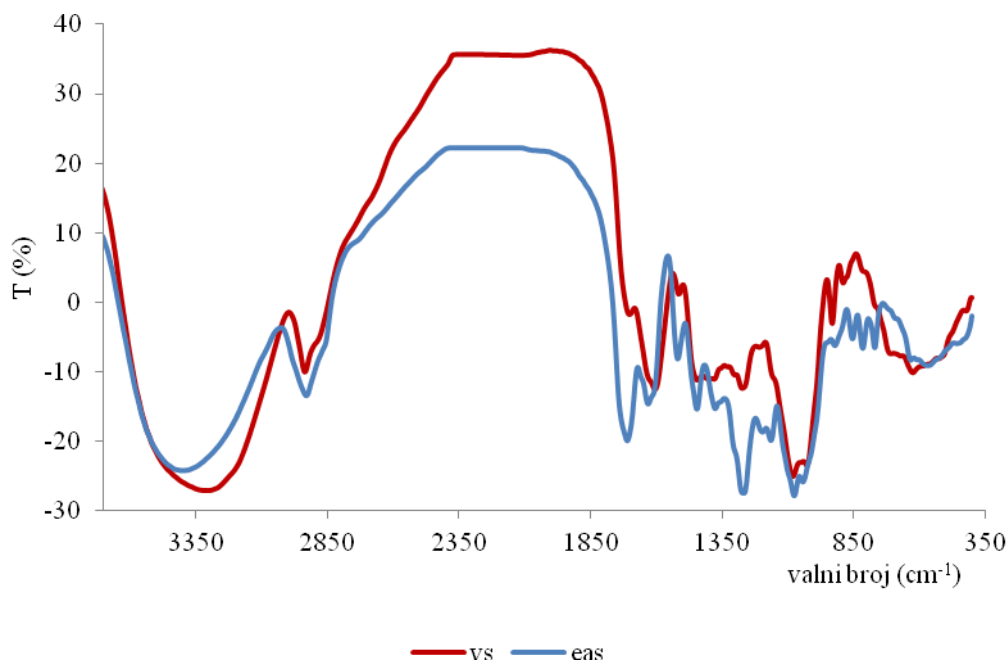
kromatografija uz etil-acetat kao eluens, a dobivene su tri dominantne frakcije: žuto-smeđa (m=39,5 mg), žuta (m=76 mg) i zelena (m=23,9 mg). Snimljen je IR spektar tih frakcija kako bi se karakterizirale funkcijske skupine spojeva koji prevladavaju u određenoj frakciji.

### 4.3. Infracrvena spektroskopija

Zračenje u infracrvenom području jednako je energiji koja izaziva molekulske vibracije. Uzorak izložen infracrvenom zračenju, uz kontinuiranu promjenu valne duljine ( $\lambda$ ), apsorbira u spektrometru upadno zračenje koje energetski odgovara pojedinim molekulskim vibracijama. Energije rasteznih vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između 4000 i 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Taj dio spektra koristi se za određivanje funkcionalnih skupina organskih spojeva te se često naziva područje funkcionalnih skupina, zato što su položaj i karakteristike apsorpcijskih vrpca većine funkcionalnih organskih spojeva pri tim valnim duljinama razmjerno nepromjenjive [18].

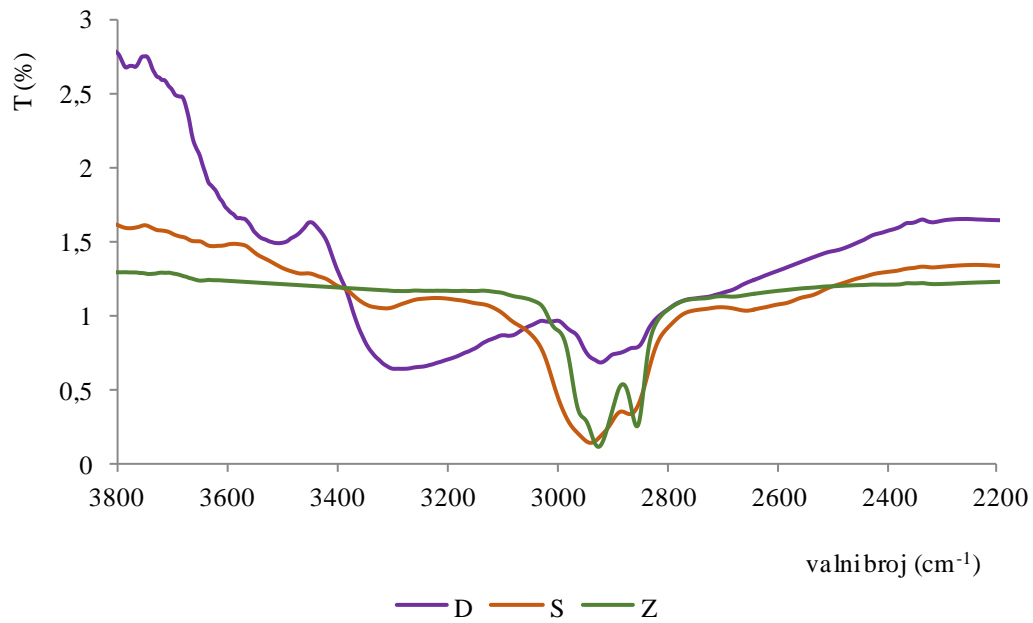
U snimljenim IR spektrima (slika 15.) prisutna je široka apsorpcijska vrpca oko 3350  $\text{cm}^{-1}$  koja se pripisuje hidroksilnoj skupini koja je uključena u vodikove veze. Intenzitet te apsorpcijske vrpce je izrazito jak što se pripisuje velikom udjelu hidroksilnih skupina koje su prisutne u spojevima koji se nalaze u ispitanim ekstraktima **1** i **2**. Asignirane apsorpcijske vrpce srednjeg intenziteta pri 2927 i 2848  $\text{cm}^{-1}$  pripisuju se rasteznoj frekvenciji veze C-H. Prisutnost C=C veze u svim snimljenim IR spektrima je potvrđena apsorpcijskom vrpcom u području 1620–1680  $\text{cm}^{-1}$ . U području od 1650 do 1850  $\text{cm}^{-1}$ , koje se pripisuje frekvenciji rastezanja svih karbonilnih skupina, asignirana je apsorpcijska vrpca oko 1710  $\text{cm}^{-1}$  koja ukazuje na prisutnost karbonilne skupine fenolnih derivata, a također potvrđuje estersku vezu budući da su fenolni spojevi u listu masline prisutni u obliku estera (ekstrakt **2**) i slobodnih kiselina (ekstrakt **1**). Asignirane apsorpcijske vrpce oko 1075 i 1030  $\text{cm}^{-1}$  odgovaraju istezanjima C-O i C-C veze etera koja potvrđuje prisutnost glikozidne veze. Na osnovi asigniranih apsorpcijskih vrpca potvrđena je prisutnost fenolnih spojeva odnosno flavonoida u svim snimljenim frakcijama što je u suglasju s literaturnim podacima, koji govore kako su najdominantniji fenolni spojevi, odnosno flavonoidi izolirani iz lista masline; oleuropein, hidroksitirozol, luteolin-7-glukozidi, apigenin-7-glukozidi i verbaskozidi. Usporedbom apsorpcijskih vrpca asigniranih u IR spektrima ekstrakta **1** i **2** vidljivo je kako se razlikuju u području apsorpcijskih vrpca koje karakteriziraju karbonilnu skupinu i područje od 1700 do 800  $\text{cm}^{-1}$  što ukazuje da je prilikom ekstrakcije tekuće-tekuće s etil-acetatom došlo do raspodjele fenolnih spojeva s obzirom na njihovu polarnost odnosno polarnost otapala,

vode i etil-acetata. Ovi rezultati su u suglasju s dobivenim rezultatima koncentracije ukupnih fenola i flavonoida koji ukazuju na veću zastupljenost u etil-acetatnom ekstraktu nego u vodi.

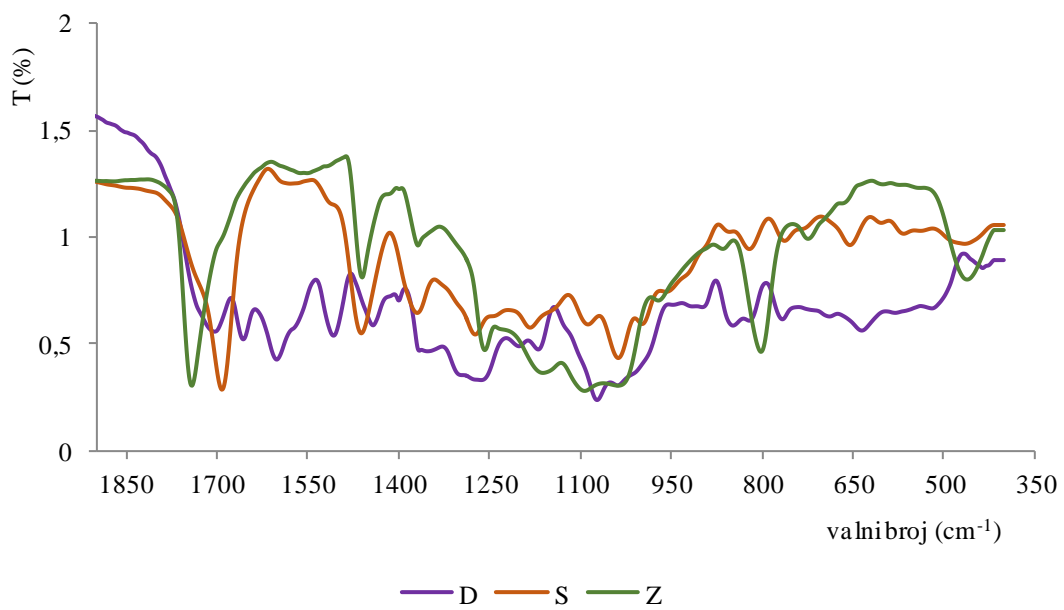


Slika 15. IR spekter vodenog (—) i etil-acetanog (—) ekstrakta

Snimljeni su i IR spektri dominantnih frakcija (slika 16.) nakon pročišćavanja PTLC-om. IR spekter najpolarnije frakcije (frakcija **D**) ukazuje na prisutnost asociranih (oko  $3300\text{ cm}^{-1}$ ) i slobodnih (oko  $3500\text{ cm}^{-1}$ ) hidroksilnih skupina, dok se u spektru frakcije **Z** ne nalaze ove apsorpcijske vrpce. Također u području IR spektra karakterističnog za karbonilnu skupinu uočena je razlika u sastavu ovih frakcija. Najmanje polarna frakcija **Z** u spektru ima apsorpcijsku vrpcu pri  $1743\text{ cm}^{-1}$ , što je karakteristično za estersku vezu, npr. kod oleuropeina, dok u spektru frakcije **D** u tom području je prisutna apsorpcijska vrpca pri  $1705\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje karboksilnoj skupini u fenolnim spojevima. Na osnovu asigniranih apsorpcijskih vrpca (slika 16.), može se potvrditi prisutnost funkcijskih skupina koje su karakteristične za fenolne spojeve prisutne u listu masline, a primarno se to odnosi na oleuropein, hidroksitirozol, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid i verbaskozid.



(a)



(b)

*Slika 16.* IR spektri dominantnih frakcija (donja **D**, srednja **S** i najgornja **Z**) u području 3800-2200  $\text{cm}^{-1}$  (a) i 1900-350  $\text{cm}^{-1}$  (b)

#### **4.4. Koncentracija ukupnih fenola i flavonoida**

U ovom radu, nakon provedene ekstrakcije tekuće-tekuće u sustavu etil-acetat/voda, određena je koncentracija ukupnih fenola, 30,98 mg GAE/g te koncentracija ukupnih flavonoida, 7,13 mg QE/g. U Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu diplomskog rada (Ivana Španić), određene su bile i koncentracije ukupnih fenola i flavonoida nakon ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišen tlak (ASE). Dobivene su prosječne vrijednosti za ukupne fenole  $53,15 \pm 0,24$  mg GAE/g i  $8,66 \pm 0,05$  mg QE/g za ukupne flavonoide [21]. Vidljivo je kako su te vrijednosti više u odnosu na one dobivene nakon podvrgavanja uzorka ekstrakciji tekuće-tekuće. U skladu s poznatim svojstvima o boljoj topljivosti fenolnih spojeva u manje polarnim otapalima kao što su benzen, diklormetan ili etil-acetat, dobiveni rezultati ukazuju na veći udio fenolnih spojeva, odnosno flavonoida, u etil-acetatnom ekstraktu.



## 5. ZAKLJUČAK

- U prvom dijelu završnog rada 50%-tni etanolni ekstrakt lista masline podvrgnut je ekstrakciji tekuće-tekuće uz sustav etil-acetat/voda čime je provedena izolacija fenolnih spojeva.
- Drugi dio završnog rada odnosi se na pročišćavanje smjese fenolnih spojeva preparativnom tankoslojnom kromatografijom pri čemu su izolirane tri dominantne frakcije. Dobivene frakcije karakterizirane su pomoću IR spektroskopije. Potvrđena je prisutnost fenolnih spojeva, odnosno flavonoida u svim snimljenim frakcijama što je u suglasju s literaturnim podacima, koji govore kako su najdominantniji fenolni spojevi, odnosno flavonoidi izolirani iz lista masline; oleuropein, hidroksitirozol, luteolin-7-glukozidi, apigenin-7-glukozidi i verbaskozidi.
- Masena koncentracija ukupnih fenola i flavonoida u etil-acetatnom ekstraktu određena je u trećem dijelu završnog rada. Iznosila je 30,98 mg GAE/g za ukupne fenole te 7,13 mg QE/g za ukupne flavonoide. Masene koncentracije ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima masline (ekstrakt **2**) ukazuju na veću zastupljenost fenolnih spojeva u etil-acetatu, kao nepolarnijem otapalu, nego u vodi.
- Temeljem provedenih istraživanja može se zaključiti kako je list masline značajan izvor fenolnih spojeva s mogućim biološkim potencijalom.

## 6. LITERATURA

- [1] Guerrero Maldonado, N., López, M. J., Caudullo, G., de Rigo, D. (2016) *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., ur., Luxembourg, str. 111.
- [2] Kantoci, D. (2006) *Olea prima omnium arborum est*. Columella. *Glasnik Zaštite Bilja* **29**: 4-14.
- [3] Anter, J., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Demyda-Peyras, S., Moreno-Millán, M., Alonso-Moraga, Á., Muñoz-Serrano A., de Castro, M. D. L. (2011) A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **723**: 165-170.
- [4] 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. *Nutrición hospitalaria* **31**: 1427-1433.
- [5] Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., Boas, L. V. (2006) Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* **12**: 385-395.
- [6] Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M. (2015) Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants* **4**: 682-698.
- [7] 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 Chemistry* **68**: 457-462.
- [8] Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Patumi, M., Nucci, R. (2002) Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology* **93**: 109-119.
- [9] Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P., Ferguson, L. R. (2016) Evidence to support the Anti-Cancer effect of olive leaf extract and future Directions. *Nutrients* **8**: 513.
- [10] Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. **55**: 279-290.

- [11] Erdman, J. W., 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. *The Journal of nutrition* **137**: 718S-737S.
- [12] Makowska-Wąs, J., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Tyszka-Czochara, M., Szewczyk, A., Nunes, R., de Carvalho I., Michalik M., Paško, P. (2017) Identification of predominant phytochemical compounds and cytotoxic activity of wild olive leaves (*Olea europaea* L. ssp. *syvestris*) harvested in south Portugal. *Chemistry & biodiversity* **14**: 3.
- [13] Zhou, D. Y., Sun, Y. X., Shahidi, F. (2017) Preparation and antioxidant activity of tyrosol and hydroxytyrosol esters. *Journal of Functional Foods* **37**: 66-73.
- [14] Carrera-González, M. P., Ramírez-Expósito, M. J., Mayas, M. D., Martínez-Martos, J. M. (2013) Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in food science & technology* **31**: 92-99.
- [15] Rapić, V. (2008) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, 2. izd., Školska knjiga, Zagreb, str. 52-58, str. 91-92.
- [16] De Castro, M. L., Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* **1217**: 2383-2389.
- [17] James, C. S. (1995) Analytical Chemistry of Foods, 1. izd., Blackie Academic & Professional, Glasgow, str. 91-93.
- [18] Pine, S. H. (1994) Organska kemija, 3. izd., Školska knjiga, Zagreb, str. 1095-1103.
- [19] Mehrotra, R. (2000) Infrared Spectroscopy, Gas Chromatography/Infrared in Food Analysis, John Wiley & Sons, Ltd., str. 1532-1537.
- [20] Sito, S., Dovečer, S., Borić, V., Ploh, M., Borić, M. (2015) Uređaji i oprema za proizvodnju čaja od maslinovog lista. *Glasnik Zaštite Bilja* **38**: 28-32.
- [21] Španić, I. (2016). *Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista masline primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Lea Čengić*

---

Lea Čengić