

# Optimizacija ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz listova masline (*Olea europaea* L.) pomoću polipropilen glikola

---

Ivanković, Stella

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:532918>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Stella Ivanković

**Optimizacija ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz  
listova masline (*Olea europaea* L.) pomoću  
polipropilen glikola**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić i suvoditeljstvom dr.sc. Marijana Marijana.

*Iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić i pomoćnom mentoru dr. sc. Marijanu Marijanu na nesebičnim savjetima, prenesenom znanju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojoj obitelji na velikoj podršci.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. List masline .....	1
1.2. Polifenoli .....	4
1.2.1. Flavonoidi .....	6
1.2.2. Fenolne kiseline .....	7
1.2.3. Oleuropein .....	8
1.3. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija .....	10
1.4. Polipropilen glikol .....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE .....	14
3.1.1. Uređaji .....	14
3.1.2. Materijal .....	14
3.1.3. Priprema otapala .....	15
3.2. METODE ISPITIVANJA .....	16
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....	16
3.2.2. Ekstrakcija na magnetnoj miješalici .....	16
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola .....	16
3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida .....	17
3.2.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina .....	17
3.2.6. Određivanje oleuropeina .....	18
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>19</b>
4.1. Ultrazvučna ekstrakcija .....	19
4.1.1. Utjecaj mase i otapala na količinu ukupnih polifenola .....	19
4.1.2. Utjecaj mase i otapala na količinu oleuropeina .....	21
4.2. Usporedba ekstrakcijskih metoda .....	22
4.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola .....	23
4.2.2. Sadržaj ukupnih flavonoida .....	25
4.2.3. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina .....	27
4.2.4. Sadržaj oleuropeina .....	29
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>30</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>35</b>

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....**

# 1. UVOD

## 1.1. List masline

Biljna droga list masline (*Oleae folium*, Slika 1) dobiva se od biljne vrste *Olea europaea* L. (*Oleaceae*). Naziv roda *Olea* dolazi od grčke riječi *elaea* koja označava maslinu. Ime vrste *europaea* govori o mjestu rasprostranjenosti biljke. Prema definiciji 6. izdanja Europske farmakopeje (Ph. Eur.), biljnu drogu list masline čine osušeni listovi biljke koji sadržavaju minimalno 5% oleuropeina ( $C_{25}H_{32}O_{13}$ ; Mr 540.5).

Maslina je zimzeleno stablo koje raste na obalnim područjima Mediterana. Naraste do 10 metara u visinu i ima razgranatu krošnju. Listovi su nasuprotni, kožnati, lancetasti, dugi 3-10 cm, široki do 2 cm te na naličju srebrnasto-sivi. Cvate u travnju i svibnju. Maslina je vrlo cijenjena mediteranska biljka. Upotrebljavaju se prvenstveno plodovi, mesnate koštunice koje dozrijevaju u rujnu i listovi, koji se beru tijekom cijele godine. I plodovi i listovi su gorkog okusa zbog prisustva sekoiridoida oleuropeina. Plodovi se jedu ili prerađuju u maslinovo ulje koje je poznato kao temelj zdrave mediteranske prehrane ([www.plantaea.com.hr](http://www.plantaea.com.hr)).



Slika 1. List masline (*Olea europaea* L. folium, *Oleaceae*).

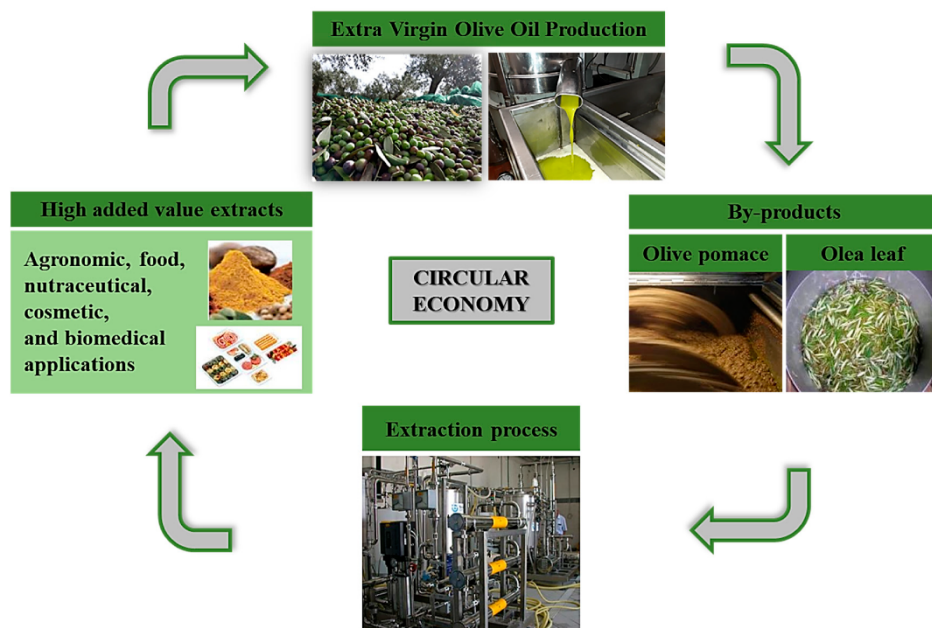
([olivewellnessinstitute.org](http://olivewellnessinstitute.org))

Bogat fitokemijski sastav lista masline obuhvaća iridoide, flavonoide, fenolne kiseline, triterpene, kalkone i kumarine. Sekoiridoidi prisutni u listu masline su: oleuropein (kao 6-*O*-glikozid i aglikon), ligstrozid, metiloleuropein i oleozid. Također sadrži flavonoide: apigenin, kemferol, luteolin i krizoeriol te fenolne spojeve: kavenu kiselinu, tirozol i hidroksitirozol.

Sadrži još triterpene: oleanolnu i maslinsku kiselinu, kalkone: olivin, olivin-4-*O*-diglukozid i kumarine: eskuletin, eskulin i skopoletin. Kvaliteta i udio pojedinih komponenata u biljnom materijalu ovise o genetskim faktorima, kvaliteti tla, geografskoj lokaciji, klimi i ostalim vanjskim faktorima koji djeluju na biljku kada ona raste i razvija se (Assesment report on *Olea europaea* L., folium, EMA, 2017; Schulz i sur., 2001).

Biološki učinak lista masline pripisuje se prvenstveno fenolnim sastavnicama (polifenolima, flavonoidima, oleuropeinu i fenolnim kiselinama). Listovi masline posjeduju zaštitne antioksidativne i protuupalne učinke. Ekstrakt listova masline povoljno utječe na kožu zbog prisustva flavonoida. Oni stimuliraju sastavnice vezivnog tkiva na obnovu čime preveniraju starenje kože (Sabry, 2014). Provođena su istraživanja koja dokazuju da list masline snižava povišen krvni tlak i da inhibira receptore za LDL kolesterol. Europska agencija za lijekove (EMA- *European medicines agency*), odobrava upotrebu svježih ili suhih, usitnjenih ili listova u obliku praška, kao i njihovih pripravaka u odraslih osoba. Listovi se koriste kao diuretik zasebno ili u kombinaciji s drugim biljnim tvarima. Primjenjuju se za oralnu upotrebu u obliku čaja ili u čvrstom obliku. EMA je karakterizirala biljni preparat lista masline kao siguran i djelotvoran biljni pripravak na temelju 30-godišnje „tradicionalne upotrebe“ s pozitivnim ishodima u liječenju zdravstvenih tegoba (Markhali i sur., 2020; Assesment report on *O. europaea* L., folium, EMA, 2017).

Iako biljne sastavnice koje se mogu ekstrahirati iz listova imaju snažan biološki učinak listovi se rijetko koriste u fitoterapiji nego se obično promatraju kao nusproizvod uzgoja maslina, odnosno kao otpadna biomasa. Iz toga proizlazi značajan ekološki, ekonomski i medicinski potencijal za proizvodnju ljekovitih pripravaka i kozmetike iz jeftine sirovine kao što su listovi masline. Slika 2 prikazuje princip kružnog gospodarstva kod proizvodnje maslinovog ulja. Nusprodukti prilikom izrade maslinovog ulja su maslinova komina i listovi masline. Oboje se dalje mogu preraditi u korisne proizvode. Iz komine se dobiva stočna hrana, visokokaloričan ogrjev, ili kada je kompostirana, organsko gnojivo. Iz listova se izoliraju aktivne molekule koje se uklapaju u nove proizvode. Na taj se način održivom ekonomijom postiže maksimalna korist od dostupnih sirovina i smanjuje proizvodnja otpada (Romani i sur., 2019; Musa Özcan i Matthäus, 2017).



Slika 2. Kružno gospodarstvo kod proizvodnje maslinovog ulja (Romani i sur., 2019).



## 1.2. Polifenoli

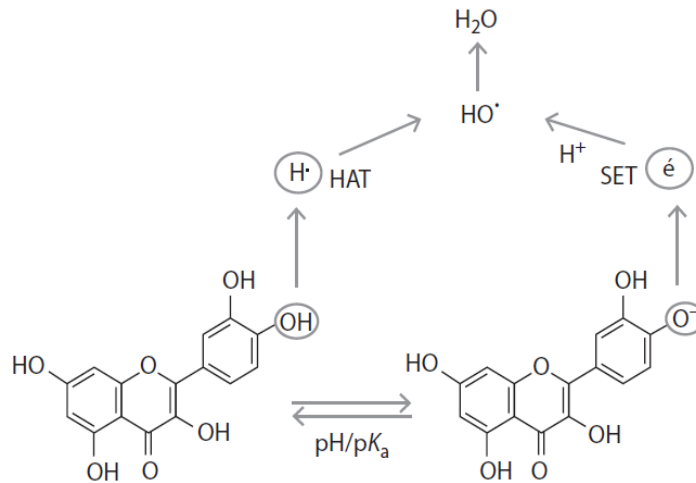
Polifenoli su heterogena skupina molekula koje su u prirodi prisutne kao sekundarni biljni metaboliti. Ljudi svakodnevno konzumiraju polifenole konzumirajući hranu biljnog podrijetla. Zanimljivi su spojevi za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog spoznaja da fenolima bogata hrana značajno smanjuje rizik za razvoj kardiovaskularnih događaja i tumorskih bolesti. Prosječan dnevni unos polifenola varira ovisno o prehrani (voće, povrće, žitarice, čaj, kava i začini sadrže polifenole) (Gómez-Maqueo i sur., 2018).

Polifenoli su spojevi koji sadrže jedan ili više benzenskih prstena za koji su vezane barem dvije hidroksilne grupe, ali postoje i prirodni produkti koji sadrže samo jedan benzenski prsten s jednom hidroksilnom skupinom. Gledajući strukturu molekule, polifenoli se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: flavonoidi i neflavonoidni fenoli. Obje skupine se u grubo dijele na 6 podskupina. Opisano je više od 8000 struktura polifenolnih spojeva (Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017).

Pozitivni učinci polifenolnih spojeva na zdravlje se objašnjavaju njihovim dobro utvrđenim antioksidacijskim svojstvima. Dokazana je sposobnost polifenolnih spojeva da *in vitro* hvataju reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive oxygen species*, ROS). ROS je termin za slobodne radikale na kisikovom atomu (primjerice superoksidni anion, hidroksilni radikal) ili neradikalne molekule koje mogu otpustiti elektron čime postaju slobodni radikali (vodikov peroksid, jednostavni singletni kisik).

Mehanizam kojim polifenoli stabiliziraju reaktivne kisikove vrste prikazan je na Slici 3, a temelji se na njihovoj sposobnosti da doniraju vodikov atom ili slobodni elektron slobodnom radikal. Na prikazanom primjeru, polifenol je flavonoid kvercetin, a ROS je hidroksilni radikal. Molekula nastala njihovom reakcijom nije štetna za susjedne molekule. U većini slučajeva, antioksidacijski potencijal polifenolnog spoja je proporcionalan broju vodikovih i elektron donirajućih fenolnih skupina, ali i strukturnoj lokaciji navedenih funkcionalnih grupa. Polifenoli djeluju kao reaktanti za kisikove reaktivne spojeve: reduciraju i kelatiraju ione željeza koji kataliziraju lipidnu peroksidaciju ili inaktiviraju slobodne radikale prijenosom vodika ili donirajući elektron radikal. Aglikoni (molekule bez šećera) pokazuju bolju antioksidativnu aktivnost od glikoziliranih fenolnih spojeva. Zanimljivo je da ekstrakt lista masline posjeduje veću antioksidativnu aktivnost od vitamina C i E. Razlog tomu je

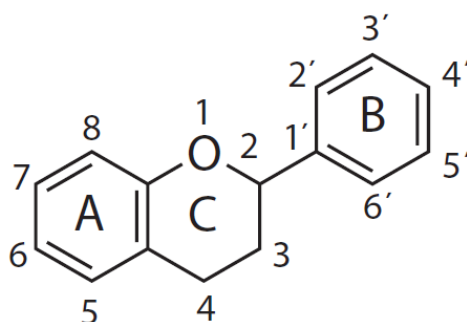
sinergija između flavonoida, oleuropeina i supstituiranih fenola koji se zajedno pojavljuju u listu masline (de Lima Cherubim i sur., 2020; Sucharita i sur., 2019; Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017; Benavente-Garcia i sur., 2000).



Slika 3. Prijenos vodikovog atoma (HAT) ili slobodnog elektrona (SET) s polifenola na slobodni radikal (Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017).

### 1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najšire zastupljeni polifenolni spojevi u biljnom svijetu. Čine 2/3 ukupnih polifenolnih spojeva koje ljudi unose prehranom. Ime potječe od latinske riječi *flavus* što označava žuto, boju u kojoj se u prirodi pojavljuju u laticama, voću, listovima. Osnovna struktura flavonoida (difenilpropanski skelet ili flavanska jezgra), prikazana na Slici 4, sastoji se od dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). U većini flavonoida, propanski lanac je povezan s kisikom u heterociklički prsten. Raznolikost struktura flavonoida je uvjetovana stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. U prirodi flavonoidi najčešće imaju barem 15 ugljikovih atoma i 3 ili više hidroksilne funkcionalne skupine (od čega su 2 na prstenu A na položajima 5 i 7 te jedna ili više na prstenu B na položajima 3' ili 4'). Na osnovi molekularne strukture, dijele se u 6 podskupina: flavonoli (primjer kvercetin), flavoni, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni. U biljkama se nalaze većinom kao glikozidi (konjugati sa šećerom, najčešće glukozom), a rijetko kao aglikoni (samostalni flavonoidi, bez šećera). Najvažniji enzim koji cijepa šećer od ostatka molekule je glikozidna hidrolaza (Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017; Markhali i sur., 2020).



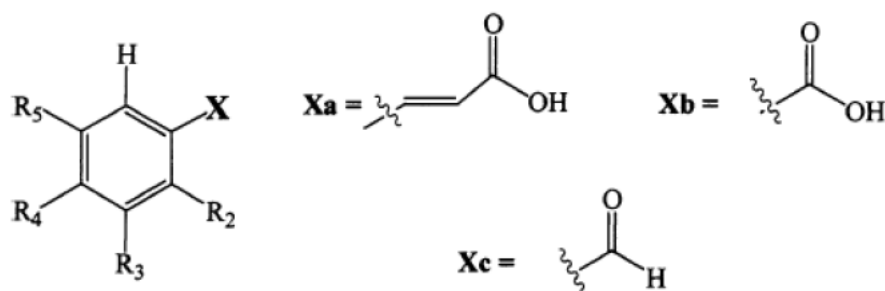
Slika 4. Osnovna struktura flavonoida.

Flavonoidi posjeduju antioksidativnu aktivnost. Hidroksilna skupina flavonoida je vrlo reaktivna i reagira s aktivnom komponentom slobodnog radikala čime radikali postaju inaktivni. Jednadžba reakcije glasi:  $flavonoid(OH) + R^{\bullet} \rightarrow flavonoid(O^{\bullet}) + RH$ , pri čemu  $R^{\bullet}$  označava slobodni radikal, a  $O^{\bullet}$  slobodan kisikov radikal (Nijveldt i sur., 2001). Glavne strukturne komponente odgovorne za antioksidativnu aktivnost jesu o-dihidroksi skupina (katehol) u prstenu B, 3 i 5-hidroksilna skupina i 2,3 dvostruka veza konjugirana s 4-okso funkcijom (Benavente-Garcia i sur., 2000). Osim antioksidativnih svojstava, flavonoidi djeluju kardioprotektivno, anti-hipertenzivno, antibakterijski i protuupalno (Sabry, 2014).

### 1.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su aromatski sekundarni biljni metaboliti široko zastupljeni u voću, kori i listovima biljaka. Druge su najčešće fenolne sastavnice u prirodi, nakon flavonoida. Klasificirane su u drugu klasu polifenola, neflavonoidni polifenoli. Ne-flavonoidni polifenoli su heterogena grupa molekula koja se također dijeli u 6 podskupina: fenolni alkoholi, fenolne kiseline, stilbeni, kumarini, kalkoni i lignani (Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017).

Osnovno obilježje fenolnih kiselina je prisustvo fenola (aromatskog prstena s barem jednom hidroksilnom funkcionalnom skupinom) koji posjeduje barem jednu karboksilnu funkcionalnu skupinu. Fenolne se kiseline dijele se na temelju strukture prikazane na Slici 5 na derivate hidroksicimetne (**Xa**; osnovna struktura je C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>; primjer je kavena kiselina) i hidroksibenzojeve kiseline (**Xb**; osnovnu strukturu čini C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> jedinica; primjer je galna kiselina). Aldehidni analozi (**Xc**) se također često svrstavaju u skupinu fenolnih kiselina. Mogu biti u slobodnom obliku, u obliku estera ili glikozida. Raznolikost fenolnih kiselina je uvjetovana brojem i položajem hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu (Robbins, 2003).



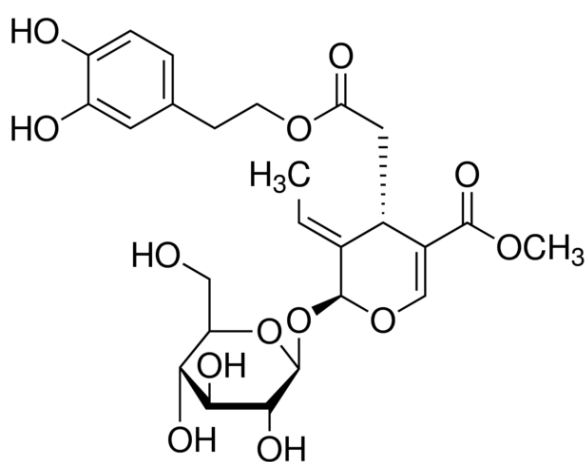
Slika 5. Osnovna struktura fenolnih kiselina u biljnim drogama (galna kiselina: **Xb** + R<sub>2, 3, 4, 5</sub> : -OH ; kavena kiselina: **Xa** + R<sub>2, 5</sub> : -H + R<sub>3, 4</sub> : -OH) (Robbins, 2003).

Karakteristike biljne vrste određuju individualan fitokemijski sastav biljke. Fenolne kiseline su u biljci prisutne u biljnom matriksu i uskladištene u vakuolama. Lako se ekstrahiraju pomoću alkohola ili organskih otapala. Povoljni učinci fenolnih kiselina na ljudsko zdravlje temelje se na visokom antioksidacijskom potencijalu i zaštiti stanica od oksidativnih oštećenja. U voću su najčešće prisutni derivati hidroksicimetne kiseline, najčešće kavena kiselina i njezini derivati. Fenolne kiseline koje su dokazane u listu masline su ferulična, kavena, klorogenska, p-kumarinska i vanilična (Monteleone i sur., 2021; Robbins, 2003).

### 1.2.3. Oleuropein

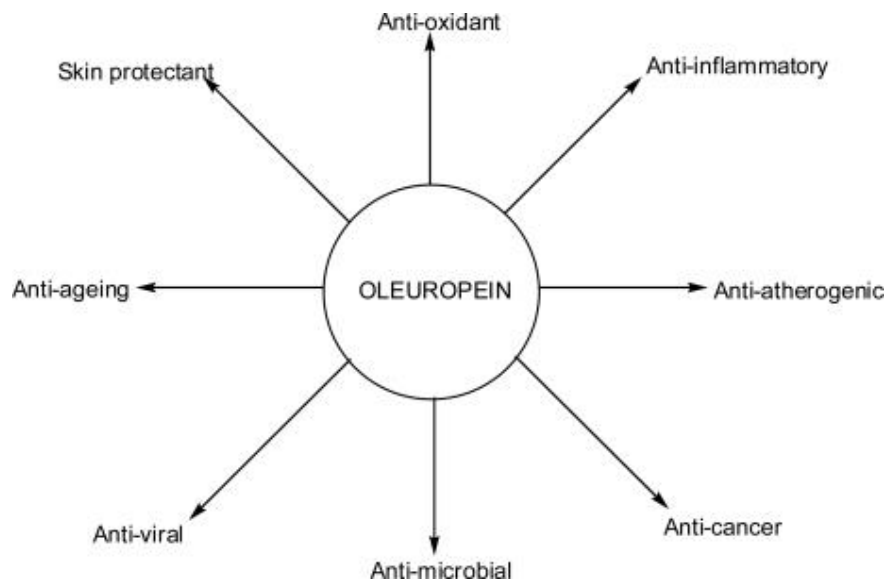
Oleuropein je najzastupljeniji fenolni spoj u listu i plodu masline. Pripada skupini sekoiridoida. Rasprostranjen je u porodicama Oleaceae, Gentianaceae i Cornaceae. Prvi puta su ga izolirali Bourquelot i Vintilesco 1908. godine. Iridoidi su derivati ciklopentanopirana, a kod sekoiridoida je ciklopentanski prsten otvoren (Omar, 2010).

Oleuropein ( $C_{25}H_{32}O_{13}$ , Slika 6) je glukozilirani ester hidroksitirozola i elenoične kiseline. Elenoičnu kiselinu sa hidroksitirozolom (3,4-dihidroksifeniletanol) povezuje esterska veza, a glikozidna veza ju povezuje s molekulom šećera. Molekula se može enzimski ili kemijski hidrolizirati na osnovne sastavnice. Pretpostavlja se da biosintetski put oleuropeina započinje iz mevalonske kiseline. U listu masline prisutni su i derivati oleuropeina, primjerice demetiloleuropein (koji ima slobodnu karboksilnu skupinu na dihidropiranskom prstenu), metilni ester oleozida (glukozid elenoične kiseline u kojem je karboksilna kiselina slobodna), ligstrozid 4 (koji umjesto dihidroski-feniletanola ima tirozol), oleozid i ostali. Sadržaj navedenih spojeva u listu masline ovisi o razvojnom stadiju lista (Murowaniecki Otero i sur., 2020).



Slika 6. Kemijska struktura oleuropeina.

Fenolne sastavnice poput oleuropeina i hidroksitirozola djeluju antioksidativno prvenstveno zbog prisutnosti *o*-difenolne skupine. Osim toga, zbog sposobnosti vezanja metalnih iona bakra i željeza (koji kataliziraju nastanak slobodnih radikala) te inhibicije upalnih enzima (primjerice lipooksigenaza) oleuropein smanjuje i stvaranje slobodnih radikala. Brojne studije potvrđuju i druge biološke učinke oleuropeina, poput protuupalnog, antiaterogeničnog, protutumorskog, antimikrobnog, antivirusnog učinka te zaštitnog učinka na kožu (Slika 7) (Omar, 2010).



Slika 7. Prikaz farmakoloških učinaka oleuropeina (Omar, 2010).

Dokazan je snažan antimikroban učinak (pridružen oleuropeinu i hidroksitirozolu) ekstrakta lista masline na 5 vrsta patogenih bakterija: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis* i *Propionibacterium acnes*, ali i nekih gljivica. Učinak se temelji na sposobnosti fenolnih spojeva da oštete citoplazmatsku membranu ili inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina. Time je spriječen proces nastanka energije u mikroorganizmima. Zbog toga ima potencijala upotrebljavati se kao pojačivač konzervansa u dermalnim pripravcima kako bi prevenirao mikrobiološku kontaminaciju. Oleuropein kao antioksidans dobiven iz prirodnog izvora privlači pažnju potrošača koji su u potrazi za prirodnom kozmetikom te ima potencijala da zamijeni sintetske antioksidanse. U studiji koju su proveli Perugini i suradnici 2008. godine, ispitan je učinak emulzija koje sadrže oleuropein na crvenilo uzrokovano suncem, odnosno UVB zračenjem (*Ultraviolet B radiation*). Preparati su nanoseni na kožu volontera prije izlaganja suncu. Primijećen je zaštitni učinak prije ozračivanja. Nadalje, primijećeno je da formulacije koje sadržavaju oleuropein ublažuju oštećenja kože izložene suncu (Perugini i sur., 2008; Musa Özcan i Matthäus, 2017).

### 1.3. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Ekstrakcija je bitan postupak za izolaciju, identifikaciju i upotrebu određenih biološki aktivnih komponenata iz biljnog materijala. To je proces kojim se uz prikladno otapalo željena tvar izdvaja iz smjese tvari zahvaljujući razlici u topljivosti tih tvari u ekstrakcijskom otapalu. Ekstrakt je koncentrirani pripravak tekućeg, praškastog ili viskoznog oblika koji se u pravilu dobiva iz suhog biljnog materijala. Uspješna ekstrakcija je ona u čijem je ekstraktu sadržaj aktivne tvari od interesa najveći, a sadržaj onečišćenja minimalan. Prilikom ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnog materijala, najčešće se govori o ekstrakcijskom sustavu čvrsto/tekuće. Ekstrakcija uključuje dva istovremena procesa: ispiranje bioaktivnih tvari iz stanica s oštećenim staničnim stijenkama te difuziju bioaktivne tvari iz biljnog materijala (čvrsto) u otapalo (tekuće). Brzina ispiranja i difuzije određuje brzinu kojom će se ekstrahirati djelatne tvari iz biljnog materijala. Na početku ekstrakcije se odvija otpuštanje bioaktivne tvari iz njezine lokacije u biljnoj stanici i otapanje topljivih komponenta na međupovršini biljnog materijala i otapala. Zatim tekuće otapalo prodire kroz pore krutog materijala pri čemu dolazi do difuzije topive tvari u otapalo. Vrsta otapala i temperatura imaju velik utjecaj na brzinu odvijanja ta dva procesa. Čimbenici koji utječu na učinkovitost ekstrakcije su veličina čestica biljnog materijala, gibanje otapala, pH i temperatura. Kod ekstrakcije određene molekule, bitna su svojstva polarnost, veličina, stabilnost i njezin naboj. Trajanje postupka i sama metoda ekstrakcije utječu na sastav ekstrakta (Chemat i sur., 2017; Sahin i Samli, 2013; Schulz i sur., 2001).

Zbog zaštite okoliša, poželjno je da se uz manju količina otapala i kraće vrijeme trajanja postupka ekstrakcije proizvede kvalitetniji ekstrakt s većom koncentracijom biološki aktivne tvari. Iz tog razloga, umjesto konvencionalnih ekstrakcijskih metoda (maceracija, destilacija i Soxhlet ekstrakcija), za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala se sve više upotrebljavaju nekonvencionalne metode poput ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakcije superkritičnim fluidom, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenim tlakom, električne ekstrakcije, turbo ekstrakcije i ekstrakcije pomoću enzima. Brojne su metode predložene za ekstrakciju fenolnih komponenata iz listova masline, uključujući napredne tehnologije poput mikrovalovima, ultrazvukom i tekućinom pod tlakom potpomognutih ekstrakcija. Zelena ekstrakcija zahtjeva minimalnu upotrebu toksičnih otapala, energije, vremena i troškova prerade uz maksimalno oslobađanje djelatnih tvari. (Murowaniecki Otero i sur., 2020; Markhali i sur., 2020; Goldsmith i sur., 2104).

Ultrazvučna ekstrakcija (eng. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE) je jeftina, ekološka, jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije. Često se koristi u ekstrakcijskim sustavima čvrsto-tekuće, za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Dolazi do učinkovitije ekstrakcije tvari iz biljnog materijala zbog kombinacije djelovanja ultrazvučne energije i konvencionalne ekstrakcije pomoću otapala. Poboljšanje ekstrakcije postignuto je nastankom akustičnih kavitacija u otapalu prolaskom ultrazvučnih valova (frekvencije više od 20 kHz). Ultrazvučne vibracije oštećuju staničnu stijenke biljnih čestica. Zbog mehaničkog učinka na biljne stanice i razorene stijenke, olakšano je ispiranje staničnog sadržaja i prijenos bioaktivnih tvari iz čvrstog biljnog matriksa u otapalo. Glavni učinak UAE je povezan s kavitacijom mjehurića zraka koja podrazumijeva lokalno stvaranje velikih količina mehaničke i termalne energije u medij. Zbog svega navedenog, ultrazvuk smanjuje otpornost prijenosu mase i poboljšava kontakt između otapala i biljnog matriksa. Ultrazvuk ima mogućnost otpuštati veze između sastavnice i biljnog matriksa čime se ubrzava difuzija i ekstrakcija tih tvari (Alcántara i sur., 2020; Hannach i sur., 2019).

UAE se smatra ekološkom metodom ekstrakcije jer omogućava znatno kraće trajanje postupka ekstrakcije uz primjenu manjih količina otapala i rad pri nižim temperaturama. Mogu se koristiti „zelena“ otapala, zbog čega su dobiveni ekstrakti sigurni za primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Ultrazvučni valovi viših frekvencija mogu potaknuti stvaranje  $\text{OH}^\bullet$  radikala. Hidrofilna struktura polifenolnih spojeva ih čini nereaktivnim za reakciju s  $\text{OH}^\bullet$  radikalima. S druge strane, UAE može spriječiti potencijalnu kemijsku degradaciju sastavnica jer koristi manje kemikalija i kraće je ekstrakcijsko vrijeme. U pravilu, povećanjem temperature se povećava prinos reakcije zbog povećanja difuzije i topljivosti bioaktivnih tvari. Temperatura UAE se smatra glavnim parametrom, jer osim povećanja prinosa, može dovesti i do promjene fizičkih i kemijskih svojstava tvari od interesa. Previsoka temperatura i velika snaga ultrazvuka mogu degradirati biljni materijal. Bitan parametar je snaga ultrazvuka koja utječe na učinkovitost ekstrakcije i sastav dobivenog ekstrakta. Važan parametar u UAE je i izbor otapala, koji ovisi o polarnosti, veličini, naboju i stabilnosti molekule koja se želi izdvojiti iz smjese te o topljivosti molekule u otapalu. Poželjna svojstva otapala za ekstrakciju su da bude neškodljiv za ljude i opremu, selektivan za sastavnice koje se žele ekstrahirati i inertan s biljnim sastavnicama, velikog ekstrakcijskog kapaciteta, potpuno hlapljiv i niske cijene. Optimalna usitnjenost i homogeniziranje uzorka omogućuju bolju ekstrakciju bioaktivnih tvari. Povećanjem dodirne površine između čvrste i tekuće faze uzrokovano je da otopljeni tvar brže difundira iz čvrste faze u otapalo. Uvjeti provođenja

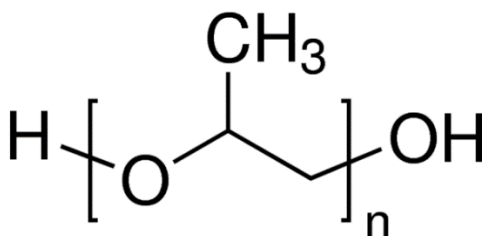


ekstrakcije znatno utječu na sastav i biološku aktivnost dobivenog biljnog ekstrakta. Za dobivanje funkcionalnog ekstrakta sa željenim sastavnicama, potrebno je optimizirati ekstrakcijsko vrijeme i temperaturu, snagu ultrazvuka, otapalo i pripremiti biljni materijal (Chemat i sur., 2017; Drmić i Režek Jambrak, 2010).

#### 1.4. Polipropilen glikol

Polipropilen glikol (PPG) (Slika 8) je polimerni spoj koji je na sobnoj temperaturi u tekućem stanju. Prozirna je i viskozna tekućina čija se viskoznost povećava, a topljivost u vodi znatno smanjuje s porastom molarne mase. Smatra se sigurnom molekulom te ima GRAS (*Generally regarded as safe*) status. Zbog svoje sigurnosti, odobren je za primjenu u ljudskim i oralnim pripravcima. PPG nije toksičan za kožu i ne škodi okolišu, biokompatibilan je i biorazgradiv. Široko se upotrebljava u farmaceutskoj, kemijskoj i prehrambenoj (kao aditiv) industriji (Jakupović i sur., 2021).

PPG niske molarne mase  $425 \text{ g mol}^{-1}$  (PPG-425) je dobro topljiv u vodi, ali i brojnim organskim otapalima. Vodene otopine PPG-a niske molekularne mase smatraju se sigurnim, netoksičnim i za okoliš neškodljivim reakcijskim otapalima. Postoje dokazi da su brojne organske molekule topljive u vodenim otopinama PPG-a niske molekularne mase (Leininger i sur., 2010).



Slika 8. Polipropilen glikol.

(<https://www.sigmaaldrich.com>)

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Bioaktivne djelatne tvari koje se mogu ekstrahirati iz biljnog materijala imaju velik potencijal za upotrebu u farmaceutskoj, prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji. Zbog utjecaja dobivenih ekstrakta na zdravlje čovjeka, ali i okoliš, prilikom ekstrakcijskog postupka je važno upotrebljavati sastavnice prirodnog podrijetla, biorazgradiva otapala i zelene metode ekstrakcije. U ovom je radu za ekstrakciju djelatnih tvari iz lista masline, koji se često tretira kao otpadna biomasa, korištena vodena otopina polipropilen glikola kao zeleno ekstrakcijsko otapalo. Određeni su optimalni uvjeti za ekstrakciju oleuropeina, ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima listova masline dobivenim dvjema ekstrakcijskim metodama, ultrazvučnom ekstrakcijom te ekstrakcijom pomoću magnetne miješalice.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE

##### 3.1.1. Uređaji

Sljedeći uređaji korišteni su u ispitivanjima: analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital 10 P, Bandelin electronic, Njemačka), magnetna miješalica (KEFO, Hrvatska), HPLC uređaj (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, USA) opremljen diode array detektorom (DAD) i Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonom (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4,6 mm, Agilent Technologies, USA) te UV/Vis spektrofotometar (FLUOSTAR Omega, BMG Labtech, Njemačka).

##### 3.1.2. Materijal

###### BILJNI MATERIJAL

Ispitivani su potpuno razvijeni, osušeni i prethodno usitnjeni listovi biljne vrste *Olea europaea* L., Oleaceae. Radi postizanja ujednačenih rezultata sadržaja bioaktivnih sastavnica iz lista masline, prilikom uzorkovanja bilo je potrebno dobro homogenizirati smjesu metodom četvrtanja (Slika 9). Biljni materijal je protresen u okrugloj posudici, istresen na stol i ravnalom podijeljen na četvrtine. Dvije dijagonalne hrpice su odbačene, a s preostalima je postupak ponovljen. U konačnici je iz dvije dijagonalne hrpice biljnog materijala uzet uzorak koji je išao u nastavak ispitivanja.



Slika 9. Homogenizacija uzorka lista masline metodom četvrtanja.

## KEMIKALIJE

Destilirana voda, Folin-Ciocalteu reagens, glacijalna octena kiselina HPLC čistoće (Scharlau; Barcelona), klorovodična kiselina, metanol (Alkaloid; Makedonija), metanol HPLC čistoće (J.T. Baker; Nizozemska), aluminijev klorid, mliječna kiselina (Merck; Njemačka), natrijev hidroksid, natrijev karbonat (Merck; Njemačka), nitrit-molibdat reagens, polipropilen glikol 425 (A&C, Kanada), galna kiselina, kavena kiselina, kvercetin i oleuropeina (Sigma-Aldrich; St.Louis, USA).

### 3.1.3. Priprema otapala

Preliminarnim pokusima koji nisu opisani u sklopu ovog rada ustanovljeni su uvjeti za najbolju ekstrakciju ukupnih polifenola i oleuropeina iz listova masline. Pokazalo se da je otapalo A (10% PPG-a, 89% vode i 1% mliječne kiseline) među ispitivanim otapalima najprikladnije za ekstrakciju ukupnih polifenola, a otapalo B (28,6% PPG-a, 63,6% vode i 7,8% mliječne kiseline) za oleuropein. Preko proporcija je određeno koliku je masu određene komponente za izradu otapala potrebno izvagati, poštujući maseni udio komponente u smjesi. U staklenu čašu su izvagani navedeni reagensi u izračunatim količinama te je sadržaj homogeniziran staklenim štapićem. Izrađeno je 10-20% više otapala od količine koja je bila propisana zbog mogućih gubitaka tijekom istraživanja.

## 3.2. METODE ISPITIVANJA

### 3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ispitivanje je provedeno koristeći 5 različitih masa biljne droge lista masline ( $m_1=0,1$  g,  $m_2=0,2$  g,  $m_3=0,4$  g,  $m_4=0,6$  g,  $m_5=0,8$  g) u oba otapala (otapalo A i otapalo B). Naziv uzorka  $A_{01}$  označava da je ekstrakt dobiven korištenjem 0,1 g lista masline i 10 g otapala A i tako redom. Izvagano je 10 uzoraka usitnjenog lista masline. U svaku od deset Erlenmeyerovih tikvica od 100 mL suspendirana je navedena masa usitnjenog biljnog materijala u 10 g odgovarajućeg otapala. Ekstrakcije uzorka su provedene u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 20 minuta pri 50% snage ultrazvuka uz kontrolu temperature na 25° C. Po potrebi, voda je u ultrazvučnoj kupelji hlađena ledom. Nakon navedenog postupka, ekstrakti su profiltrirani kroz naborani filter papir (Slika 10). Gotovi ekstrakti su do sljedeće upotrebe čuvani u hladnjaku (2-8 °C) kako bi se usporio proces razgradnje bioaktivnih tvari.



Slika 10. Ekstrakti pripremljeni korištenjem otapala B.

### 3.2.2. Ekstrakcija na magnetnoj miješalici

Ekstrakti su priređeni miješanjem 0,1 g – 0,8 g droge i 10 g otapala B na magnetnoj miješalici. Priređeni uzorci nazvani su  $B_{01M}$  –  $B_{08M}$ . Ekstrakcije su provedene pri sobnoj temperaturi (25° C) i brzini okretaja 300 okretaja u minuti u trajanju od 20 minuta. Po završetku ekstrakcije, uzorci su profiltrirani preko naboranog filter papira.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (eng. *total phenolic content*, TPC) određen je spektrofotometrijski koristeći modificiranu Folin-Ciocalteu metodu na mikrotitarskoj ploči (Singleton i sur., 1999). Folin-Ciocalteu reagens (FC) je razrijeđen s vodom u omjeru 1:3. U

jažice je otpipetirano 80  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine ekstrakta. U serijski razrijeđene otopine uzorka dodano je 80  $\mu\text{L}$  10% otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te 80  $\mu\text{L}$  vodene otopine Folin-Ciocalteu reagensa. Uzorci su stajali u tamnoj komori na sobnoj temperaturi 1 sat. Zatim je izmjerena apsorbancija na 600 nm pomoću UV-VIS spektrofotometra. Slijepa proba bila je smjesa 80  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine ekstrakta, 80  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i umjesto FC reagensa, 80  $\mu\text{L}$  vode. Kao standard je korištena pripremljena vodena otopina oleuropeina poznate koncentracije (0,166  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Sadržaj ukupnih polifenola izračunat je pomoću baždarnog pravca oleuropeina. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti oleuropeina u miligramima po mL ekstrakta (mg OLE/mL).

#### 3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (eng. *total flavonoid content*, TFC) određen je spektrofotometrijski koristeći otopinu aluminijeva klorida i mikrotitarsku ploču. U jažice mikrotitarske ploče je dodano 120  $\mu\text{L}$  metanola, 20  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg ekstrakta lista masline i dodatnih 100  $\mu\text{L}$  metanola. Otopine uzorka su serijski razrijeđene 4 puta. U serijski razrijeđene otopine uzorka (120  $\mu\text{L}$ ) dodano je 120  $\mu\text{L}$  0,2% metanolne otopine aluminijevog klorida ( $\text{AlCl}_3$ ), čime je reakcija aktivirana. Uzorci su stajali 1 sat na mračnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Zatim je izmjerena je apsorbancija na 405 nm. Kao slijepa proba korištena je smjesa 120  $\mu\text{L}$  otopine uzorka iste koncentracije i 120  $\mu\text{L}$  metanola. Sadržaj ukupnih flavonoida je izračunat iz baždarnog pravca kvercetina. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti kvercetina u miligramima po mL ekstrakta (mg QE/mL).

#### 3.2.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina (eng. *total phenolic acid content*, TPA) određen je spektrofotometrijski koristeći nitrit-molibdat reagens i mikrotitarsku ploču. Nitrit-molibdat reagens je priređen otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode. U jažice mikrotitarske ploče dodano je 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 50  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg ekstrakta lista masline i dodatnih 50  $\mu\text{L}$  vode. Otopine ekstrakta su serijski razrijeđene 4 puta. U serijski razrijeđene otopine uzorka (100  $\mu\text{L}$ ) dodano je redom: 50  $\mu\text{L}$  0,5 M HCl, 50  $\mu\text{L}$  nitrit-molibdat reagensa i 50  $\mu\text{L}$  8,5% otopine natrijeva hidroksida (NaOH). Uzorci su stajali 10 minuta u tamnoj komori te su mjerene apsorbancije na 492 nm. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je izračunat iz kalibracijske krivulje za kavenu kiselinu. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti kavene kiseline u miligramima po mL ekstrakta (mg CAE/mL).

### 3.2.6. Određivanje oleuropeina

Oleuropein je kvantificiran korištenjem HPLC (*high-performance liquid chromatography*) uređaja, uspoređujući rezultate uzorka s rezultatima standarda oleuropeina. Uzorci dobiveni nakon UAE su profiltrirani u vijalice kroz PTFE filter veličine pora 0,45 µm (Slika 11). Kroz isti filter je filtriran i standard oleuropeina. Mobilna faza A je bila 1% ledena octena kiselina, a mobilna faza B je bio metanol HPLC čistoće. Protok mobilne faze je bio 1 mL/min, a temperatura kromatografskog odjeljivanja 25 °C. Korištena je Zorbax Eclipse XDB-C18 kolona (5 µm, 250 mm × 4,6 mm). Pikovi su bili promatrani i kvantificirani na 254 nm pomoću DAD detektora. Identifikacija oleuropeina je provedena uspoređivanjem vremena zadržavanja ( $t_R$ ) i spektra pika u kromatogramu uzorka i kromatogramu standarda oleuropeina. Napravljena je kalibracijska krivulja koja je opisivala ovisnost površine ispod krivulje (AUC) pika oleuropeina ( $y$ , arbitrarne jedinice) o masi oleuropeina u uzorku ( $x$ , mg). Iz jednadžbe baždarnog pravca za oleuropein ( $y = 6,8693x + 0,0245$ ;  $R^2 = 0,9962$ ) izračunata je masa oleuropeina ( $u$  mg) u mL ekstrakta.



Slika 11. Uzorci A<sub>01</sub>-B<sub>08</sub> neposredno prije HPLC analize.

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Sva mjerenja provedena su u triplikatu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost. Obrada podataka je provedena uz pomoć programa Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je istražen učinak promjene metode i ekstrakcijskog otapala na količine odabranih polifenolnih spojeva (ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i oleuropeina) u ekstraktima.

### 4.1. Ultrazvučna ekstrakcija

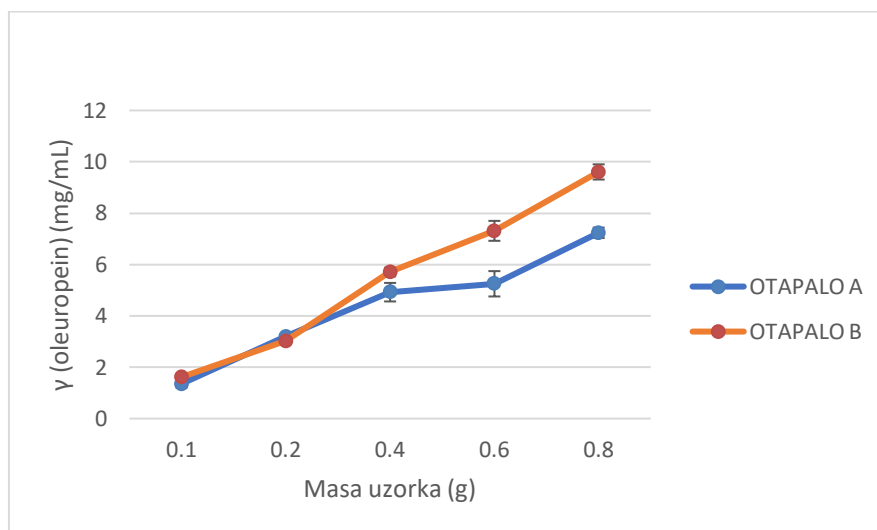
#### 4.1.1. Utjecaj mase i otapala na količinu ukupnih polifenola

Ispitivan je učinak povećanja mase lista masline od 0,1 do 0,8 grama suhe droge na povećanje koncentracije ukupnih polifenola u dva otapala različitog sastava. Količina ukupnih polifenola u uzorcima varirala je između 1,35 mg OLE/mL (A<sub>01</sub>) i 7,24 mg OLE/mL (A<sub>08</sub>), odnosno između 1,62 mg OLE/mL (B<sub>01</sub>) i 9,61 OLE mg/mL (B<sub>08</sub>) u uzorcima bogatijim PPG-om. Na Slici 12 vidi se da povećanjem mase lista masline pri masi ekstrakcijskog otapala od 10 g raste količina polifenola u obje vrste ekstrakta. U provedenom istraživanju je uočeno da povećanjem početne mase uzorka od 0,1 g do 0,5 g, količina ekstrahiranih ukupnih polifenola linearno raste za oba otapala. Možemo pretpostaviti da je razlog tomu dobra usitnjenost materijala koja povećava prodor otapala do biljnih stanica i aktivnih tvari. Daljnjim povećanjem mase droge na 0,6 g do 0,8 g, kod otapala A dolazi do smanjenja učinkovitosti ekstrakcije, odnosno do zasićenja i prestanka linearnog rasta ekstrahiranih tvari u ovisnosti o masi droge. Kod otapala B se nastavlja linearan rast sadržaja polifenola s porastom mase droge što ukazuje na izvrstan ekstrakcijski potencijal navedenog otapala.

Pokusom se htjelo ispitati na koji će se način mijenjati sadržaj ukupnih polifenola ekstrahiranih pomoću otapala A i B. Prema podacima iz literature, u kojima su fenolne komponente iz lista masline ekstrahirane vodom, očekivano je da će se povećanjem omjera biljnog materijala i otapala povećati i prinos ekstrakcije (Hannachi i sur., 2019). Dobiveni rezultati se podudaraju s navedenim podacima. Razlog je taj da povećanjem omjera čvrsto/tekuće (list masline/otapalo), više fenolnih komponenata može doprijeti u otapalo. Ekstrakcija fenolnih komponenata, dakle, znatno ovisi o omjeru čvrsto/tekuće. S druge strane, dobiveni rezultati odudaraju od principa prijenosa mase. Prema njemu, koncentracijski gradijent (koji je pokretačka snaga ekstrakcije) je veći kada je prisutno više otapala u odnosu na otopljenu tvar, što vodi do većih difuzijskih vrijednosti. U drugom istraživanju je ispitivan omjer uzorka lista masline i vode kao otapala (1:10-1:100 g/mL) te se povećanjem udjela otapala povećavao prinos polifenola dobivenih UAE (Goldsmith i sur., 2014). Sadržaj TPC u



navedenom istraživanju iznosio je 32,42 mg GAE/g za ekstrakte dobivene UAE uz uvjete 90 °C, 70' i omjer suhih listova i vode 1:60 g/mL. Hannachi i suradnici odredili su da sadržaj ukupnih polifenola u listovima masline varira između 0,90 i 5,31 g GAE/100 g suhe tvari (UAE; 40 °C, 1-5', 100-300 W).



Slika 12. Ovisnost masene koncentracije ukupnih polifenola o masi lista masline za otapala A i B uz UAE.

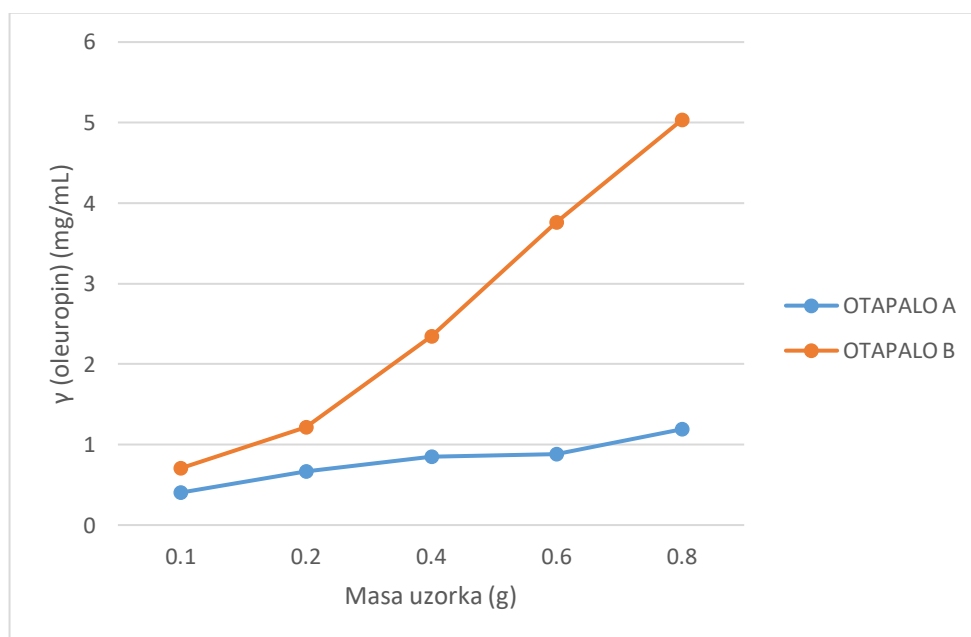
Topljivost otapala i svojstva bioaktivne molekule su bitni faktori koji utječu na vrstu i količinu polifenola ekstrahiranih iz listova masline. Univerzalno pravilo za izbor prigodnog otapala glasi: „Slično se otapa u sličnom“. Za ekstrakciju polarnih fenola, fenolnih kiselina i flavonoida najprikladnija su polarna otapala poput vode, metanola, etanola i njihovih smjesa. Na ekstrakciju polifenola utječu i molekulske interakcije (na primjer vodikove veze) između polifenola i ostalih makromolekula (proteina, polisaharida) prisutnih u matriksu biljnog materijala (Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017). Dodatak vode organskom otapalu može poboljšati učinkovitost ekstrakcije kidajući vodikove veze između aktivnih tvari i biljnog matriksa. S druge strane, povećan sadržaj vode može pospješiti otpuštanje drugih vodotopljivih sastavnica prisutnih u biljnom matriksu koji rezultira ekstraktom koji ima više onečišćenja i manji sadržaj polifenola. To je moguć razlog zašto je u otapalu A, koje je bogatije vodom, određeno manje polifenola nego u otapalu B, koje je bogatije PPG-om. Kombinacija dvaju otapala i/ili dodatak površinski aktivnih tvari ili kiselina može povoljno utjecati na ishod ekstrakcije. U ovom radu je korištena mliječna kiselina kao pojačivač ekstrakcije. Kiselina

smanjuje pH vode čime se povećava njezina hidrolitička sposobnost i povećava se otpuštanje bioaktivnih molekula koje su vezane za stanične strukture (Mustafa i Turner, 2011).

Literaturni podaci pokazuju da je najveći sadržaj ukupnih polifenola u listu masline dobiven koristeći 40-70% etanolnu otopinu kao otapalo (Cuevas-Valenzuela i sur., ured., 2017). Postoje i studije koje favoriziraju upotrebu čiste vode kao zeleno i ekonomično otapalo koje osigurava dobar prinos ukupnih polifenola (Hannachi i sur., 2019; Kovačić i sur., 2017; Romani i sur., 2016). Prema literaturnim podacima, dokazano je da upotreba PPG može smanjiti potrebu za korištenjem organskih otapala u ekstrakcijskim smjesama prilikom ekstrakcije polifenolnih sastavnica (Jakupović i sur., 2021).

#### 4.1.2. Utjecaj mase i otapala na količinu oleuropeina

Ispitivan je učinak povećanja mase lista masline od 0,1 do 0,8 g suhe droge na povećanje koncentracije oleuropeina u dva otapala različitog sastava. Količina oleuropeina varirala je od 0,40 mg/mL (A<sub>01</sub>) do 5,03 mg/mL (B<sub>08</sub>) u otapalu bogatijem PPG-om.



Slika 13. Ovisnost masene koncentracije oleuropeina o masi lista masline za otapalo A i B uz UAE

Slika 13 prikazuje da je sadržaj oleuropeina u ekstraktima statistički značajno varirao ovisno o masi lista masline i korištenom otapalu. Sadržaj oleuropeina je znatno veći u ekstraktima bogatijem PPG-om. Kod ekstrakcije pomoću otapala A, oleuropein se slabo ekstrahirao i došlo je do zasićenja već pri niskoj masi droge. Povećanje sadržaja oleuropeina s

povećanjem mase lista masline između 0,1 g i 0,8 g u otapalu A nije pokazalo značajne rezultate. Kod otapala B primijećen je linearan porast ekstrahiranog oleuropeina s porastom mase lista masline uzete u ispitivanje. Veća količina biljnog materijala podvrgnutog ekstrakciji rezultirala je većom količinom ekstrahiranog oleuropeina. Zbog veće količine biljnog matriksa, više fenolnih komponenata moglo je doći do otapala.

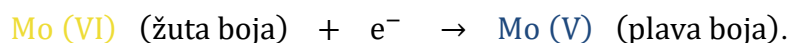
Polarnost otapala imala je velik utjecaj na vrstu spoja koji se ekstrahirao. Nizak sadržaj oleuropeina u otapalu A može se objasniti hidrolizom oleuropeina u vodi na njegove sastavne komponente: hidroksitirozol, eleničnu kiselinu i glukozu. Oleuropein je polaran spoj ( $M_r=540.5$ ) dobro topljiv u polarnim otapalima, ali sklon je hidrolizi. Otapalo B sadrži 18,6% više PPG-a te 6,8% više mliječne kiseline u odnosu na otapalo A koji umjesto njih sadrži vodu. PPG u svojoj strukturi sadrži ponavljajuće jedinice metilne skupine zbog kojih je hidrofobniji od vode. Dodatkom PPG-a, koji se miješa s vodom te dodatkom mliječne kiseline, poboljšan je prinos oleuropeina zbog smanjenog hidrolitičkog učinka vode. Zbog navedenog razloga je korisno osušiti listove odmah nakon branja kako bi se reducirala količina vlage i smanjila degradacija uzorka tijekom skladištenja (Sucharita i sur., 2019; Wang i sur., 2018).

#### 4.2. Usporedba ekstrakcijskih metoda

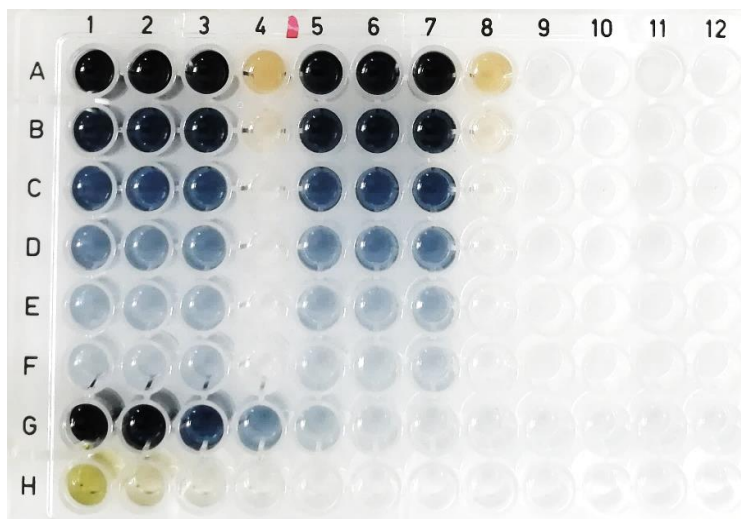
Uspoređivan je sadržaj bioaktivnih komponenata iz listova masline u ekstraktima dobivenim uz pomoć ultrazvuka i ekstrakcijom na magnetnoj miješalici (MAG). Svrha je bila odrediti optimalne uvjete za dobivanje maksimalne količine aktivnih spojeva zelenom metodom ekstrakcije. U prethodno provedenim ispitivanjima, ekstrakti dobiveni u otapalu B imali su veći sadržaj ukupnih polifenola i oleuropeina. Zbog toga su svi daljnji eksperimenti bili provedeni koristeći otapalo B.

#### 4.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola

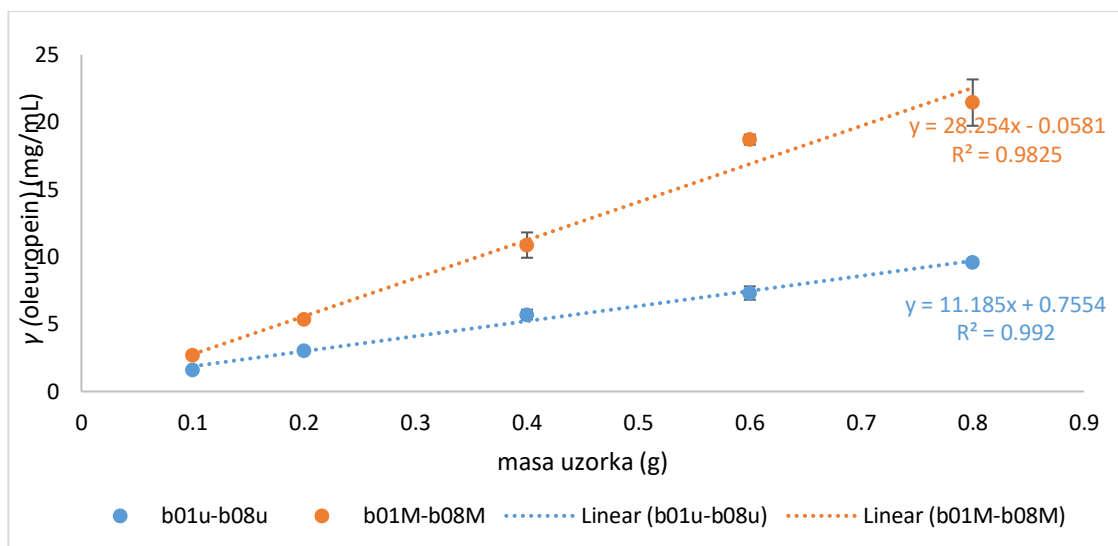
Sadržaj ukupnih polifenola u biljnom materijalu određen je spektrofotometrijski pomoću FC reagensa. Metoda se temelji na prijenosu elektrona između FC reagensa i fenolnog spoja u lužnatom mediju, pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks čiji se sadržaj određuje spektrofotometrijski. Pojednostavljen mehanizam reakcije prikazan je jednadžbom:



Smatra se da se reagens sastoji od kiselina koje sadrže atome molibdena i volframa i žute su boje. U lužnatom mediju (koji se postiže dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u reakcijsku smjesu) disociraju protoni s molekule fenolnih sastavnica ekstrahiranih iz biljnog materijala, pri čemu nastaje fenolatni ion. Smatra se da fenolatni ion reducira kompleksne ione FC reagensa koji u drugom valentnom stanju ima drugačiju boju (Slika 14). Nedostatak metode jest činjenica da mnoge nefenolne sastavnice također mogu reagirati s FC reagensom čime se dobiva lažno viši sadržaj polifenola. U ispitivanju ukupnih polifenola se najčešće kao poredbena tvar koristi galna kiselina, dok je u ovom radu kao standard korišten oleuropein (Singleton i sur., 1999).



Slika 14. Mikrotitarska ploča s plavo obojenim, serijski razrijeđenim otopinama uzorka nakon reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom kod određivanja TPC.



Slika 15. Masene koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenom UAE i MAG.

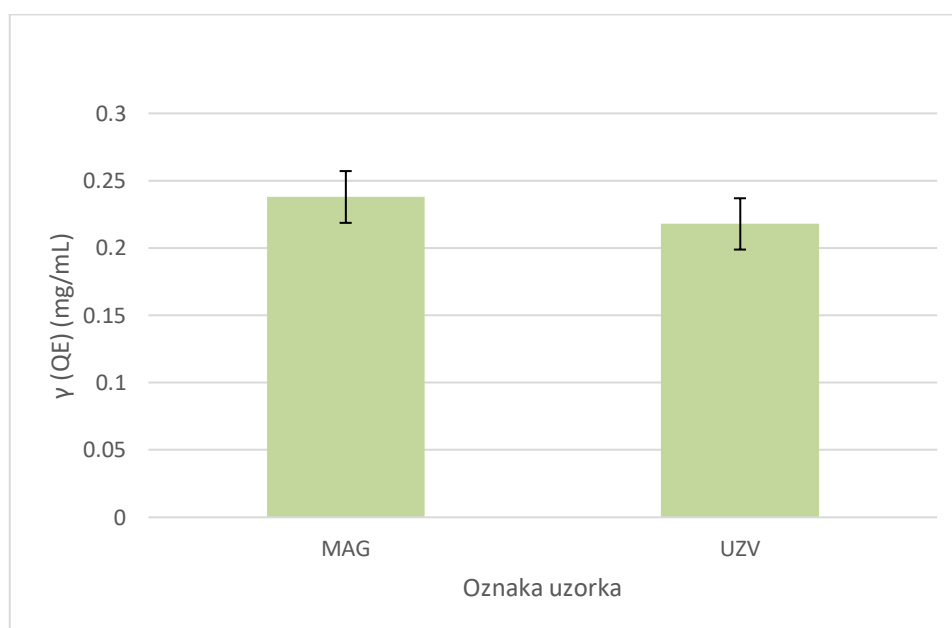
Slika 15 prikazuje utjecaj metode ekstrakcije na količinu ekstrahiranih ukupnih polifenola. Količina ukupnih polifenola varirala je od 1,62 mg OLE/mL (B<sub>01</sub>) do 9,61 mg OLE/mL (B<sub>08</sub>) u ekstraktima dobivenim UAE, odnosno od 2,68 mg OLE/mL (B<sub>01M</sub>) do 21,45 mg OLE/mL (B<sub>08M</sub>) u ekstraktima dobivenim MAG.

Voda je jeftino i neškodljivo polarno otapalo pogodno za ekstrakciju mnogih fenolnih komponenata prisutnih u listu masline. Kovačić i suradnici su istražili učinkovitost ekstrakcije prelijevanjem usitnjenog lista masline istarskih vrsta kipućom vodom i stajanjem na sobnoj temperaturi između 5 i 30 minuta. Sadržaj TPC je varirao između 0,45 i 30,28 mg GAE/g suhe tvari (Kovačić i sur., 2017). Dobiveni rezultati nisu usporedivi s literaturnim podacima jer su prethodno obavljene analize izražavale sadržaj ukupnih polifenola kao miligrame ekvivalenata galne ili kavene kiseline.

Rezultati pokusa su pokazali da je MAG u prosjeku dvostruko učinkovitija metoda u odnosu na UAE za ekstrakciju ukupnih polifenola iz listova masline. Miješanje ekstrakcijske smjese magnetom je dinamična metoda ekstrakcije u kojoj otapalo kontinuirano prodire kroz biljni materijal čime je pospješen izlazak bioaktivnih sastavnica iz biljnog matriksa. Dobiveni rezultati se podudaraju s literaturnim podacima u kojima se konvencionalna metoda ekstrakcije pomoću mehaničkog mješača pokazala učinkovitijom od ultrazvučne ekstrakcije. Konvencionalna metoda ekstrakcije je imala veći prinos ukupnih polifenola u usporedbi s UAE, neovisno o vrsti otapala (Alcántara i sur., 2020).

#### 4.2.2. Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u biljnom materijalu određen je spektrofotometrijskom metodom. Postupak se temelji na stvaranju stabilnog kompleksa aluminijskih iona s flavonoidima iz uzorka pri čemu se reakcijska smjesa oboji žuto. Metoda može u određenim uvjetima detektirati i druge polifenole što može dovesti do nerealnih rezultata, dakle metoda nije specifična. Prosječan sadržaj flavonoida u ekstraktu iznosio je 0,24 mg QE/mL uzorka u ekstraktima dobivenim MAG i 0,22 mg QE/mL u ekstraktima dobivenim UAE.



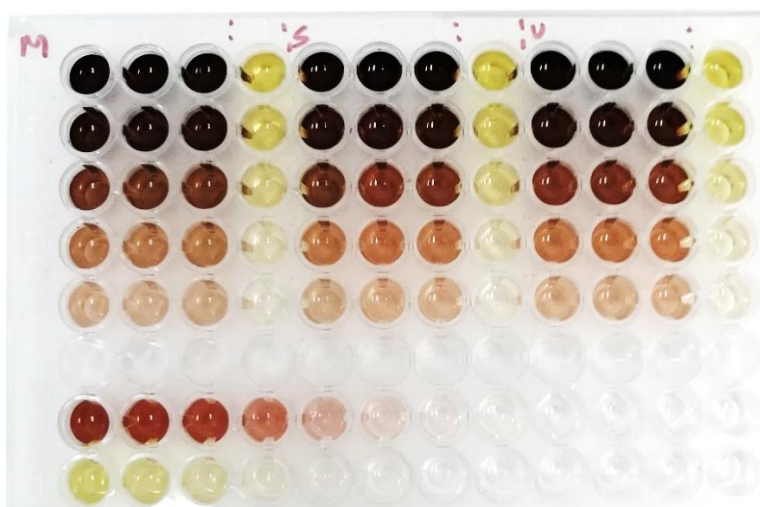
Slika 16. Masena koncentracija flavonoida u ekstraktima dobivenom uz MAG i UAE.

Slika 16 uspoređuje masenu koncentraciju flavonoida u ekstraktima dobivenom miješanjem na magnetskoj miješalici i pomoću ultrazvuka. Više flavonoida određeno je u ekstraktima dobivenim na magnetnoj miješalici. Sadržaj flavonoida u MAG uzorku iznosio je 1,28%. Prema literaturnim podacima, u listovima masline flavonoidi čine do 1,8% masenog udjela, od čega najviše (0,8%) ima luteolin-7-O-glukozida (Omar, 2010). Dobiveni rezultati podudaraju se s navedenim podatkom. Maleš i Tučkar su u metanolnim ekstraktima listova hrvatskih maslina identificirali 4 flavonoida: kvercetin, luteolin-7-O-glukozid, rutin i luteolin. Sadržaj flavonoida računat kao kvercetin iznosio je 0,09 - 0,53% (Maleš i Tučkar, 1998). Kovačić i suradnici su odredili da vrijednost ukupnih flavonoida ekstrahiranih vodom varira od 0,15 – 30,34 mg CE/g suhog lista, ovisno o usitjenosti i trajanju postupka infuzije (Kovačić i sur., 2017). Kao uvjeti za najbolju ekstrakciju flavonoida postignutu uz UAE određeni su 50°

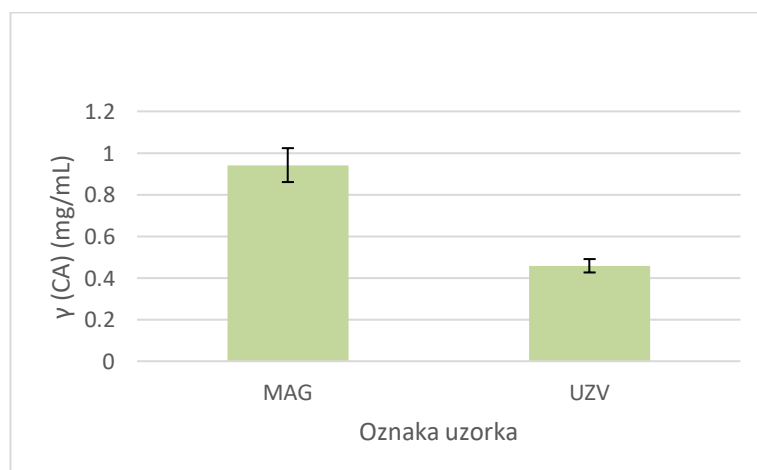
C, snaga ultrazvuka 270 W, 50 min vrijeme ekstrakcije i 41 mL/g omjer metanola i uzorka. U tim uvjetima, sadržaj ukupnih flavonoida izraženih kao ekvivalenti rutina po gramu suhe tvari iznosio je 74,95 mg RE/g (Wang i sur., 2018).

#### 4.2.3. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina u biljnom materijalu određen je spektrofotometrijskom metodom. Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koja s nitrit-molibdat reagensom daje žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine boja prelazi u narančasto crvenu (Slika 17) (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2016). Metoda može u određenim uvjetima detektirati i druge polifenole, zbog čega nije precizna. Prosječan sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu iznosio je od 0,94 mg CA/mL uzorka u ekstraktima dobivenim MAG i 0,46 mg CA/mL u ekstraktima dobivenim UAE.



Slika 97. Mikrotitarska ploča sa smeđe obojenim, serijski razrijeđenim otopinama uzorka nakon reakcije s nitrit-molibdat reagensom kod određivanja TPA.



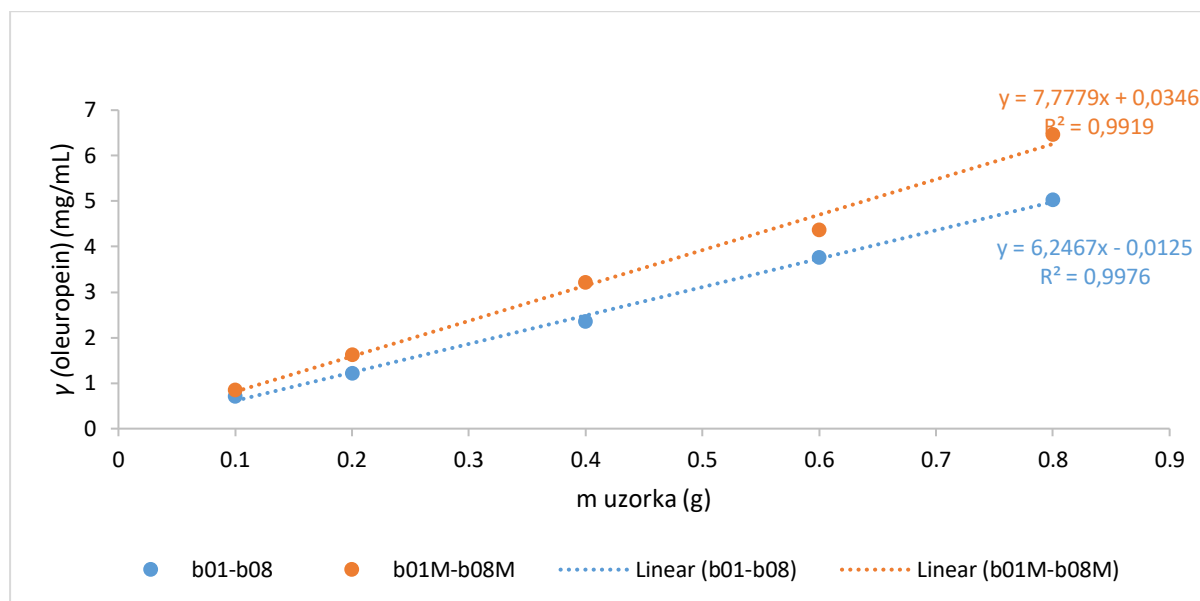
Slika 18. Usporedba koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima dobivenom uz MAG i UAE.



Slika 18 prikazuje masenu koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima dobivenom koristeći MAG i UAE. Dvostruko više fenolnih kiselina je pronađeno u MAG ekstraktima. Razlog bolje ekstrakcije može se pridružiti mehaničkom učinku magneta koji pospješuje miješanje uzorka ili mogućoj degradaciji fenolnih kiselina pod utjecajem ultrazvuka.

Fenolne kiseline koje ulaze u tu sumu, a sadržane su u listu masline su ferulična, kavena, klorogenska, p-kumarinska i vanilična kiselina (Monteleone i sur., 2021). Prema literaturnim podacima, sadržaj fenolnih kiselina u listovima masline ovisio je o vrsti otapala i metodi ekstrakcije. Primjerice, sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima dobivenim UAE (4 h, sobna temperatura, 47 kHz) uz 80% etanol i destiliranu vodu kao ekstrakcijsko sredstvo iznosio je 6,61% u etanolnim i 0,55% u vodenim ekstraktima (Ghomari i sur., 2019). Sadržaj fenolnih kiselina u MAG uzorku iznosio je 5,04%. Dobiveni rezultati se podudaraju sa spomenutim literaturnim podacima, ali zbog nepreciznosti metode određivanja fenolnih kiselina korištene u ovom radu, rezultati se ne mogu uspoređivati s onima dobivenim pomoću HPLC.

#### 4.2.4. Sadržaj oleuropeina



Slika 19. Usporedba masenih koncentracija oleuropeina u ekstraktu dobivenom MAG i UAE.

Slika 19 prikazuje utjecaj metode ekstrakcije na količinu ekstrahiranog oleuropeina. Količina oleuropeina u uzorcima iznosila je između 0,71 mg/mL (B<sub>01</sub>) i 5,03 mg/mL (B<sub>08</sub>) u uzorcima dobivenim UAE, odnosno između je od 0,85 mg/mL (B<sub>01M</sub>) i 6,47 mg/mL (B<sub>08M</sub>) u uzorcima dobivenim MAG. Rezultati su pokazali da je MAG u prosjeku 25% učinkovitija metoda za ekstrakciju oleuropeina iz listova masline u odnosu na UAE. Magnet mehanički pospješuje prodor otapala do dijelova biljnih stanica u kojima se nalazi oleuropein i time povećava njegov prinos.

Prema literaturnim podacima oleuropein u listovima masline čini do 19% masenog udjela (Omar, 2010). Sadržaj oleuropeina u uzorcima premašivao je 30%. Dobiveni rezultati prikazuju da količina oleuropeina u uzorcima varira ovisno o metodi ekstrakcije. Rezultati se podudaraju s literaturnim podacima u kojima se konvencionalna metoda ekstrakcije pomoću mehaničkog mješalca pokazala učinkovitijom od ultrazvučne ekstrakcije (Alcántara i sur., 2020).

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom su istraživanju, primjenom ultrazvuka i magnetske miješalice uspješno ekstrahirani oleuropein i ostali polifenoli iz listova masline (*O. europaea*). Vodena otopina PPG-a i mliječne kiseline pokazala se dobrim otapalom za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz listova masline. Povećanje udjela PPG-a i mliječne kiseline, kao i biljnog materijala pri ultrazvučnoj ekstrakciji, rezultiralo je višim vrijednostima TPC i znatno višim vrijednostima oleuropeina. Najveći utjecaj na sadržaj polifenolnih spojeva imala je metoda ekstrakcije. UAE se pokazala inferiornijom metodom ekstrakcije koja je dovela do nižih vrijednosti ekstrahiranih biološki aktivnih spojeva. Ekstrakcija MAG je ekonomična i učinkovitija metoda za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz listova masline u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju. Tom su metodom određeni polifenolni spojevi s prosječnim vrijednostima: (i) 21,45 mg OLE/mL za ukupne polifenole (ii) 0,24 mg QE/mL za ukupne flavonoide (iii) 0,94 mg CAE/mL za ukupne fenolne kiseline (iv) 6,47 mg/mL za oleuropein. Iz navedenih rezultata može se uočiti potencijal ekstrakta lista masline kao antioksidativne komponente i opravdati njegova upotreba kao sastojka kozmetičkih proizvoda.

## 6. LITERATURA

Alcántara C, Žugčić T, Abdelkebir R, García-Pérez JV, Jambrak AR, Lorenzo JM, Collado MC, Granato D, Barba FJ. Effects of Ultrasound-Assisted Extraction and Solvent on the Phenolic Profile, Bacterial Growth, and Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities of Mediterranean Olive and Fig Leaves Extracts. *Molecules*, 2020, 25, 1718.

Assessment report on *Olea europaea* L., folium, EMA, 2017,1-45. EMA/HMPC/359236/2016

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

Blažeković B, Vladimir- Knežević S. Praktikum iz farmakognozije 1. Zagreb, Zavod za farmakognoziju, 2016, str. 16.

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrason Sonochem*, 2017, 34, 540-560.

Spiesky H, Fuentes J, Dorta E, Lopez-Alarcon C. Polyphenols Sources and Main Characteristics. U: Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols. Cuevas-Valenzuela J, Perez-Correa JR, Vergara-Salinas JR, urednici, United States, Taylor & Francis Group, 2017, str. 1-10.

de Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L, da Silva de Lucca RA. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol-US*, 2020, 19, 33-37.

Drmić, H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol*, 2010, 2, 22-33.

Ekstrakcija bioaktivnih biljnih sastavnica pomoću zelenih otapala – korak prema zelenim kozmeceutici, 2018., [www.pharma.unizg.hr](http://www.pharma.unizg.hr), pristupljeno 20.05.2021.

Ghomari O, Sounni F, Massaoudi Y, Ghanam J, Batsoule Drissi Kaitouni L, Merzouki M, Benlemlih M. Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2019, 23, e00347.

Goldsmith CD, Vuong QV, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Antioxidants (Basel)*, 2014, 3, 700-712.

Gómez-Maqueo A, Escobedo-Avellaneda Z, Cano MP, Welti-Chanes J. Phenolic Compounds in Food. U: Phenolic Compounds in Food, Characterization and Analysis. Nollet LML, Gutierrez-Urbe JA, urednici, USA, Taylor & Francis Group, 2018, str. 33-52.

Hannachi H, Benmoussa H, Saadaoui H, Saanoun I, Negri N, Elfalleh W. Optimization of ultrasound and microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves by response surface methodology. *Res J Biotechnol*, 2019, 14, 28-37.

Jakupović L, Kalvarešin M, Bukovina K, Poljak V, Vujić L, Zovko Končić M. Optimization of Two Eco-Friendly Extractions of Black Medick (*Medicago lupulina* L.) Phenols and Their Antioxidant, Cosmeceutical,  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Properties. *Molecules*, 2021, 26, 1610.

Kovačić I, Bilić J, Dudaš S, Poljuha D. Phenolic content and antioxidant capacity of istrian olive leaf infusions. *Agriculture*, 2017, 23, 38-45.

Leininger NF, Clontz R, Gainer JL, Kirwan D. Polyethylene glycol-water and polypropylene glycol-water solutions as benign reaction solvents. *Chem Eng Commun*, 2003, 190, 431-444.

Maleš Ž, Tučkar D. Kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida listova masline – *Olea europaea* L. *Farm Glas*, 1998, 54, 1-4.

Markhali FS, Teixeira JA, Rocha CMR. Olive Tree Leaves—A Source of Valuable Active Compounds. *Processes*, 2020, 8, 1177.

Maslina: *Olea europaea* L., 2021., [www.plantaea.com.hr](http://www.plantaea.com.hr), pristupljeno 21.04.2021.

Monteleone JI, Sperlinga E, Siracusa L, Spagna G, Parafati L, Todaro A, Palmeri R. Water as a Solvent of Election for Obtaining Oleuropein-Rich Extracts from Olive (*Olea europaea*) Leaves. *Agronomy*, 2021, 11, 465.

Murowaniecki Otero D, Moreria Oliveira F, Lorini A, da Fonseca Antunes B, Moerira Oliviera R, Carlos Zambiasi R. Oleuropein: Methods for extraction, purifying and applying. *Rev Ceres*, 2020, 67, 315-329.

Musa Özcan M, Matthäus B. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Eur Food Res Technol*, 2017, 243, 89-99.

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

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418-25.

*Olea europaea* L. folium, 2021., [olivewellnessinstitute.org](http://olivewellnessinstitute.org), pristupljeno 21.04.2021.

Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*, 2010, 78, 133-154.

Perugini P, Vettor M, Rona C, Troisi L, Villanova L, Genta I, Conti B, Pavanetto F. Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation. *Int J Cosmet Sci*, 2008, 30, 113-20.

Poly(propylene glycol), 2021., [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), pristupljeno 21.04.2021.

Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51,2866-87.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, Bernini R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 2019, 11, 1776.

Romani A, Pinelli P, Ieri F, Bernini R. Sustainability, Innovation, and Green Chemistry in the Production and Valorization of Phenolic Extracts from *Olea europaea* L. *Sustainability*, 2016, 8, 1002.

Sabry O. Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. *J Nat Sci Res*, 2014, 4, 1-9.

Şahin S, Samlı R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20, 595-602.

Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. Chapter 1 - Medicinal Plants, Phytomedicines and Phytotherapy. U: Rational Phytotherapy. Schulz V, Hänsel R, Tyler VE, urednici, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2001, str. 4-7.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999, 299, 152–178.

Sucharita P, Satyanarayana SV, Bhaskar Reddy K. Pretreatment and optimization of processing conditions for extraction of oleuropein from olive leaves using central composite design. *Pharmacogn Res*, 2019, 11, 178-187.

Wang B, Qu J, Luo S, Feng S, Li T, Yuan M, Huang Y, Liao J, Yang R, Ding C. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from Olive (*Olea europaea*) Leaves, and Evaluation of Their Antioxidant and Anticancer Activities. *Molecules*, 2018, 23, 2513.

## 7. SAŽETAK

Listovi masline smatraju se jeftinim biljnim materijalom koji se može koristiti kao izvor visokovrijednih polifenolnih spojeva. U ovom radu su razvijene dvije ekološki prihvatljive metode za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz lista masline, koristeći netoksičnu smjesu vode, polipropilen glikola i mliječne kiseline kao otapalo. Za ekstrakciju polifenola iz lista masline korištene su ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija i ekstrakcija magnetnom miješalicom. Ispitan je učinak dvaju ekstrakcijskih parametara: omjer sastavnica otapala i omjer čvrstog prema tekućem (0,1-0,8 g/10 mL) na fenolni profil. Sadržaj oleuropeina, glavne bioaktivne komponente u listu masline, je određen pomoću RP-HPLC-DAD-a. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina je određen spektrofotometrijskim metodama. Povećanje organskog otapala i biljnog materijala u ultrazvučnoj ekstrakciji rezultiralo je višim vrijednostima ukupnih polifenola i oleuropeina. Analizom fenolnih sadržaja dobivenih ekstrakata utvrđeno je da je konvencionalna metoda ekstrakcije uz magnetnu miješalicu učinkovitija u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju. Određeni su sadržaji polifenola uz magnetnu miješalicu pri 25 °C i 20': ukupni polifenoli 21,45 mg OLE/mL, ukupni flavonoidi 0,24 mg QE/mL, ukupne fenolne kiseline 0,94 mg CAE/mL i oleuropein 6,47 mg/mL.



## SUMMARY

Olive leaves are considered to be a cheap herbal material that can be used as a source of phenolic compounds with high added value. In this work, two environmentally friendly methods for the extraction of bioactive components from olive leaves were developed using non-toxic mixtures of water, polypropylene glycol, and lactic acid as a solvent. Ultrasound-assisted extraction and extraction with a magnetic stirrer of polyphenols from olive leaves were investigated and the phenolic contents of obtained extracts were compared. In this thesis, two extraction parameters were examined: ratio of solvent components and the ratio of solid to solvent (0,1-0,8 g/10 mL) on the phenolic profile. The content of oleuropein, the main bioactive compound in the extracts was determined using RP-HPLC-DAD. Total phenol, flavonoid, and phenolic acid content were determined by spectrophotometric methods. The increase of organic solvent and plant material in the ultrasound-assisted extraction resulted in increased total phenol content and oleuropein. The analysis of phenolic content of obtained extracts suggested that conventional extraction with a magnetic stirrer was more effective compared to an ultrasound-assisted extraction. Obtained contents of phenolics using magnetic stirrer at 25 °C and 20' were: total phenol content 21,45 mg OLE/mL, total flavonoid content 0,24 mg QE/mL, total phenolic acid content 0,94 mg CAE/mL and oleuropein content 6,47 mg/mL

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTOVA MASLINE (*Olea europaea* L.) POMOĆU POLIPROPILEN GLIKOLA

Stella Ivanković

#### SAŽETAK

**Sažetak:** Listovi masline smatraju se jeftinim biljnim materijalom koji se može koristiti kao izvor visokovrijednih polifenolnih spojeva. U ovom radu su razvijene dvije ekološki prihvatljive metode za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz lista masline, koristeći netoksičnu smjesu vode, polipropilen glikola i mliječne kiseline kao otapalo. Za ekstrakciju polifenola iz lista masline korištene su ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija i ekstrakcija magnetnom miješalicom. Ispitan je učinak dvaju ekstrakcijskih parametara: omjer sastavnica otapala i omjer čvrstog prema tekućem (0,1-0,8 g/10 mL) na fenolni profil. Sadržaj oleuropeina, glavne bioaktivne komponente u listu masline, je određen pomoću RP-HPLC-DAD-a. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina je određen spektrofotometrijskim metodama. Povećanje organskog otapala i biljnog materijala u ultrazvučnoj ekstrakciji rezultiralo je višim vrijednostima ukupnih polifenola i oleuropeina. Analizom fenolnih sadržaja dobivenih ekstrakata utvrđeno je da je konvencionalna metoda ekstrakcije uz magnetnu miješalicu učinkovitija u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju. Određeni su sadržaji polifenola uz magnetnu miješalicu pri 25 °C i 20': ukupni polifenoli 21,45 mg OLE/mL, ukupni flavonoidi 0,24 mg QE/mL, ukupne fenolne kiseline 0,94 mg CAE/mL i oleuropein 6,47 mg/mL.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 19 slika, 1 tablicu i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: list masline, polipropilen glikol, ultrazvučna ekstrakcija (UAE), magnetna miješalica, polifenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, oleuropein, zelena ekstrakcija

Mentor: **Prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Marijan Marijan**, asistent- znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### OPTIMISATION OF POLYPROPYLENE GLYCOL EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM OLIVE LEAVES (*Olea europaea* L.)

Stella Ivanković

#### SUMMARY

**Summary:** Olive leaves are considered to be a cheap herbal material that can be used as a source of phenolic compounds with high added value. In this work, two environmentally friendly methods for the extraction of bioactive components from olive leaves were developed using non-toxic mixtures of water, polypropylene glycol, and lactic acid as a solvent. Ultrasound-assisted extraction and extraction with a magnetic stirrer of polyphenols from olive leaves were investigated and the phenolic contents of obtained extracts were compared. In this thesis, two extraction parameters were examined: ratio of solvent components and the ratio of solid to solvent (0,1-0,8 g/10 mL) on the phenolic profile. The content of oleuropein, the main bioactive compound in the extracts was determined using RP-HPLC-DAD. Total phenol, flavonoid, and phenolic acid content were determined by spectrophotometric methods. The increase of organic solvent and plant material in the ultrasound-assisted extraction resulted in increased total phenol content and oleuropein. The analysis of phenolic content of obtained extracts suggested that conventional extraction with a magnetic stirrer was more effective compared to an ultrasound-assisted extraction. Obtained contents of phenolics using magnetic stirrer at 25 °C and 20' were: total phenol content 21,45 mg OLE/mL, total flavonoid content 0,24 mg QE/mL, total phenolic acid content 0,94 mg CAE/mL and oleuropein content 6,47 mg/mL.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 19 pictures, 1 table and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive leaf, polypropylene glycol, ultrasound-assisted extraction (UAE), magnetic stirrer, polyphenols, flavonoids, phenolic acids, oleuropein, green extraction

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** /Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** /Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijan Marijan, Ph.D.** /Assistant research- associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** /Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2021.

