

Utjecaj temperature skladištenja na fenolni sastav lista i grančice masline

Fadljević, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:368657>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



Repository / Repozitorij:

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



Mihaela Fadljević

**Utjecaj temperature skladištenja na fenolni
sastav lista i grančice masline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju i Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ane Karković Marković i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Monike Barbarić.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Ani Karković Marković i komentorici prof. dr. sc. Moniki Barbarić na stručnom vodstvu, strpljenu, pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Mnogo hvala i prof. dr. sc. Ani Mornar Turk i doc. dr. sc. Danieli Amidžić Klarić sa Zavoda za analitiku lijekova za provođenje HPLC analize ekstrakata te dr. sc. Goranu Poje i dr. sc. Marini Marinović sa Zavoda za farmaceutsku kemiju na pomoći s uparavanjem ekstrakata.

Zahvaljujem i prof. dr. sc. Đani Benčiću sa Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na donaciji lista i grančica masline.

Zahvaljujem roditeljima i prijateljima na pruženoj podršci, ljubavi i brizi tijekom studiranja i pisanja ovog rada.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 MASLINA	1
1.1.1. Maslina (<i>Olea europaea</i> L.), morfologija i uzgoj	1
1.1.2. Utjecaj maslinarstva na okoliš	2
1.1.3. Uporaba i biološka svojstva ekstrakta lista masline.....	2
1.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA I GRANČICE MASLINE	4
1.2.1. Kemijski sastav lista masline	4
1.2.2. Oleuropein	6
1.2.3. Utjecaj temperature skladištenja na sadržaj fenola	8
1.2.4. Kemijski sastav grančice masline	9
1.3. ANALITIČKE TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLA U EKSTRAKTU LISTA I GRANČICA MASLINE	10
1.3.1. UV-Vis spektroskopija	10
1.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Uzorci	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Instrumenti i pribor	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva	18
3.2.2. UV-Vis spektrofotometrijske analize fenola	18
3.2.2.1. Priprema otopina uzoraka za UV-Vis analizu	18

3.2.2.2. Priprema otopina reagensa za UV-Vis analizu	19
3.2.2.3. Određivanje ukupnih fenola	19
3.2.2.4. Određivanje <i>o</i> -difenola	20
3.2.2.5. Određivanje ukupnih flavonoida	21
3.2.3. HPLC analiza sadržaja oleuropeina	22
3.2.3.1. Priprema otopina uzoraka	22
3.2.3.2. Priprema otopine oleuropeina	22
3.2.3.3. Priprema mobilne faze	22
3.2.3.4. Kromatografski uvjeti	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva lista i grančice masline	24
4.2. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE	26
4.2.1. Sadržaj ukupnih fenola	26
4.2.2. Sadržaj <i>o</i> -difenola	28
4.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida	30
4.3. HPLC ANALIZA	33
4.3.1. Sadržaj oleuropeina u listu i grančici masline	33
4.4. Utjecaj temperature skladištenja na fenolni sastav lista i grančice masline	37
5. ZAKLJUČCI	38
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	39
7. LITERATURA	40
8. SAŽETAK/SUMMARY	48
8.1. Sažetak	48
8.2. Summary	49

9. PRILOZI	50
9.1. HPLC analiza - prikladnost sustava i validacija metode	50
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. MASLINA

1.1.1. Maslina (*Olea europaea* L.), morfologija i uzgoj

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzelena vrsta koja pripada porodici maslinovki (*Oleaceae*). Stablo masline može biti visoko od 3 do 12 m (Selim i sur., 2022) i staro stotinama godina. List je jednostavan, tvrd i kožast, cijelih rubova, oblikom lancetast do naopako jajast, 30-50 mm dug i 10-15 mm širok. Vrh lista završava kratkim izbočenim vrhom, a pri dnu se sužava u kratku peteljku. Lice je sivkastozieleno, glatko i sjajno, a naličje je bljeđe i dlakavo, osobito duž središnje žile i glavnih bočnih žila (Ph. Eur., 2013). Listovi su po granama pravilno razdijeljeni: uvijek su po dva lista nasuprot, a grana završava s jednim listom. Samo na jednogodišnjim granama rastu cvjetovi i kasnije plodovi. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod. Plod je prvo zelen, a pred zriobu mijenja boju u tamnoljubičastu ili gotovo crnu. Dok je plod zelen, meso je gorko. Dozrijevanjem se gubi gorčina i povećava se sadržaj ulja u plodu (Kantoci, 2006). Zreli plodovi masline su glatki i ovalni, veličine oko 4 cm. Veličina ploda, boja, oblik, veličina koštice i morfologija površine značajno se razlikuju između sorti. Masline se uglavnom samooprašuju, ali se njihova proizvodnja povećava kada se oprašuju unakrsno, uglavnom vjetrom (Selim i sur., 2022). Maslina uspijeva samo u umjereno toplim krajevima u kojima se temperatura rijetko spušta ispod 0 °C. Potraju li niske temperature 2 do 3 dana, obično prozebu grančice, a potraju li dulje, prozebu grane i deblo. Zbog toga se masline uzgajaju uglavnom uz more, iako se mogu naći i na nadmorskim visinama od 500 i više metara (Kantoci, 2006). Proces rezidbe je bitan proces životnog ciklusa stabla masline. Uklanjanje starih grana daje stablu strukturu, olakšava žetvu i uravnotežuje proizvodnju. Rezidba se obično obavlja zimi, ali, ovisno o temperaturi regije, može se odgoditi do kraja sezone jer taj proces može učiniti voćnjak manje otpornim na hladnoću (Espeso i sur., 2021).

U Hrvatskoj ima više autohtonih sorti masline, a neke od njih su Oblica, Lastovka, Drobница, Levantinka, Buža, Istarska Bjelica, Bjelica, Dužica, Uljarica, Rosinjola. Oblica je naša najkvalitetnija sorta, Istarska Bjelica je najviše rasprostranjena u Istri i Kvarneru i dobro je otporna na niske temperature, a Rosinjola je autohtona hrvatska sorta iz okolice Rovinja, guste krošnje i bujnog rasta, otporna na vjetar, hladnoću i sušu (<https://izbormaslina.com>).

1.1.2. Utjecaj maslinarstva na okoliš

Današnji uzgoj maslina široko je rasprostranjen, s procjenom od 9 milijuna hektara diljem svijeta. Prema podacima iz 2023/24., Španjolska je najveći proizvođač maslinova ulja u svijetu s 766 400 t, a slijede ju Italija s 288 900 t i Turska s 210 000 t. Hrvatska se nalazi na 26. mjestu s 2 500 t (<https://worldpopulationreview.com>). Kako je industrija maslinovog ulja rasla, tako je rastao i utjecaj proizvodnje maslinovog ulja na okoliš, poput potrošnje energije i vode, emisije plinova i stvaranja otpada. Najveći doprinos stvaranju otpada daje lišće masline, obilan i nezaobilazan nusprodukt proizvodnje maslinovog ulja zbog nužnosti rezidbe stabala (Espeso i sur., 2021). Avraamides i Fatta (2008) govore da za svaku litru proizvedenog maslinovog ulja nastaje 6,23 kg ostataka rezidbe (grana i lišća). Obično se ostaci rezidbe zbrinjavaju ili spaljivanjem ili mljevenjem i rasipanjem po polju, što uzrokuje ekonomske i ekološke probleme (Guinda i sur., 2015). Po litri maslinovog ulja emitira se 3,9 kg CO₂. Procesom rezidbe proizvodi se 909 g CO₂, što je preko 23% ukupno emitiranog CO₂ pri preradi 1L maslinovog ulja. Većina tog CO₂ nastaje spaljivanjem ostataka rezidbe, kako bi se riješila biomasa i dobila energija, stvarajući 748 g CO₂ po litri maslinova ulja (Avraamides i Fatta, 2008).

1.1.3. Uporaba i biološka svojstva ekstrakta lista masline

Uporaba maslinovog lista kao sirovine za dobivanje spojeva dodane vrijednosti daje mogućnost povećanja profitabilnosti maslinika (Guinda i sur., 2015). Lišće se trenutno koristi za proizvodnju biomase ili stočnu hranu, međutim, zbog svog polifenolnog sastava, listovi masline imaju potencijal u brojnim drugim primjenama (Espeso i sur., 2021). Trenutno je komercijalna primjena maslinova lista uglavnom ograničena na narodnu medicinu, za zaštitu tijela od kroničnih stanja kao što su kardiovaskularne bolesti i dijabetes te za stočnu hranu (Markhali i sur., 2020).

Ekstrakt lista masline bi se mogao koristiti za produljenje roka trajanja hrane i za razvoj funkcionalne hrane. Posjeduje antimikrobna svojstva protiv kvasaca, plijesni i bakterija koje se prenose hranom kao što su *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* (Sudjana i sur., 2009), *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis* (Lee OH i Lee BY, 2010) te antioksidativna svojstva zbog sadržaja polifenola koja bi mogla rezultirati poboljšanjem oksidativne stabilnosti, dakle produljenjem roka trajanja proizvoda, te poboljšanjem nutritivne vrijednosti hrane. Prašci od ekstrakta maslinovog lista mogu se koristiti kao osnova za proizvodnju različitih prehrambenih proizvoda uključujući čajeve, dodatke prehrani, hranjive pločice i pića, sastojke dječje hrane, paste, kao i farmaceutske

proizvode, kozmetiku ili bilo koji proizvod kod kojeg su poželjna poboljšana antioksidativna i antimikrobna svojstva (Espeso i sur., 2021). U posljednje se vrijeme razmatra dodavanje listova masline tijekom proizvodnje maslinova ulja kao potencijalan način poboljšanja kvantitativnih, prehrambenih i senzoričkih karakteristika ulja (Novoselić i sur., 2023). Novoselić i sur. (2023) u svojem su istraživanju pokazali da je dodatak lista masline povećao prinos ulja te utjecao na povećanje ukupne koncentracije fenola, sekoiridoida i pigmentata.

Ekstrakt maslinovog lista postaje sve popularniji na globalnom tržištu nutraceutika zbog mnogo tvrdnji da ima zdravstvene dobrobiti. Osim već spomenute antioksidativne aktivnosti i antimikrobnih svojstava, provedena su i razna istraživanja koja povezuju ekstrakt lista masline i s brojnim drugim zdravstvenim učincima: neuroprotektivnim (Selim i sur., 2022; Romani i sur. 2019), antitumorskim (De Cicco i sur., 2022; Selim i sur., 2022; Romani i sur. 2019), protuupalnim (Fayez i sur., 2023; Rufino-Palomares i sur., 2022; Selim i sur., 2022), antihipertenzivnim (Pennisi i sur., 2023), hipokolesterolemijskim (Selim i sur., 2022), antiaterosklerotičnim (Pennisi i sur., 2023; Romani i sur., 2019), kardioprotektivnim (Pennisi i sur., 2023; Selim i sur., 2022; Romani i sur., 2019), hepatoprotektivnim (Rufino-Palomares i sur., 2022) te hipoglikemijskim (Pennisi i sur., 2023; Romani i sur., 2019). Listovi masline često se koriste kao dodatak prehrani kod osoba koje boluju od dijabetesa (Amidžić i sur., 2018). Kod sredovječnih muškaraca prekomjerne tjelesne težine kod kojih postoji rizik od razvoja dijabetesa, suplementacija polifenolima iz maslinovog lista tijekom 12 tjedana značajno je poboljšala osjetljivost na inzulin i sekretorni kapacitet stanica gušterače (De Bock i sur., 2013). Ekstrakt lista masline također je istraživan u njezi kože te su spomenuti njegovi anti-age učinci (Dauber i sur., 2023; Oliveira i sur., 2021), poticanje proizvodnje kolagena (Kishikawa i sur., 2015) te pro-melanogena svojstva korisna za tretiranje poremećaja hipopigmentacije kože (Goenka i Simon, 2021).

Unatoč brojnim dokazima o biološkoj aktivnosti ekstrakta lista masline i njegovih komponenti, postoji potreba za više randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja na ljudima vezano uz zdravstvene učinke ekstrakta lista masline kao i više istraživanja o njegovoj toksičnosti pošto je znanje o njegovoj sistemskoj toksičnosti ograničeno, zaključuju Acar-Tek i Ağagündüz (2020). Izdvojili su dvije studije (Clewel i sur., 2016; Guex i sur., 2018) toksičnosti koje pokazuju da su ekstrakti lista masline općenito pouzdani i da ne pokazuju toksične učinke čak ni pri visokim dozama te jednu studiju (Omer i sur., 2012) koja je izvijestila o uzrokovanju nekroze hepatocita i o krvarenju u bubrežnoj kori ispitivanih štakora uz istovremeno smanjenje kolesterola i šećera u krvi nakon uzimanja ekstrakta maslinovog lista (0,9%) tijekom 6 tjedana.

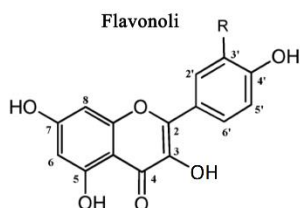
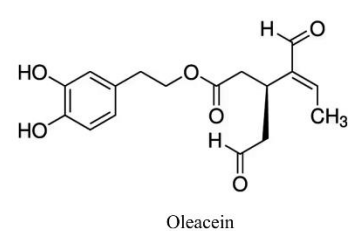
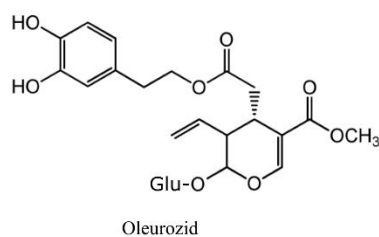
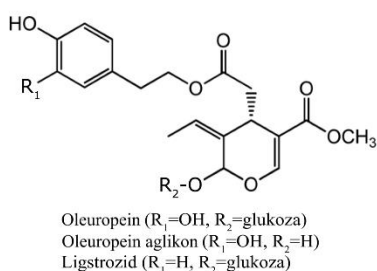
1.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA I GRANČICE MASLINE

1.2.1. Kemijski sastav lista masline

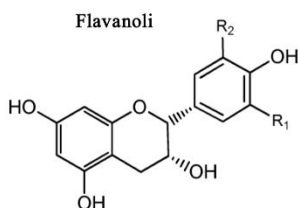
Celuloza, hemiceluloza i lignin su građevni blokovi svih listova pa tako i listova masline (Espeso i sur., 2021). List masline sadrži i neesencijalne i esencijalne aminokiseline, ponajviše lizin (Ibrahim i sur., 2016), te ugljikohidrate poput glukoze, fruktoze i saharoze, a posebice manitol, vrlo važan poliol koji je prisutan u značajnim koncentracijama (Ramírez i sur., 2022; Clodoveo i sur., 2021) te čini oko 3% mase suhog lista (Guinda i sur., 2015). Listovi masline bogati su mineralima, osobito kalcijem (11-25 g/kg suhog lista), zatim kalijem, magnezijem i fosforom u g/kg te željezom, manganom, cinkom i bakrom u mg/kg suhog lista (Pasković i sur., 2020; Ibrahim i sur., 2016). Prisutni su i terpeni i lipofilni spojevi. Glavni triterpen iz lista masline je oleanolna kiselina koja čini oko 3% mase suhog lista (Guinda i sur., 2015), zatim maslinska kiselina i manje razine α -amirina, ursolne kiseline, eritrodiola i uvalola. Ostali lipofilni spojevi uključuju zasićene ugljikovodike, skvalen, vosak, tokoferole, trigliceride, β -karoten, klorofil, linearne alkohole i masne kiseline (palmitinsku, oleinsku i linolnu kiselinu) na razini ppm (Clodoveo i sur., 2021). Nadalje, list masline sadrži razne hlapljive spojeve poput β -kubebena, β -kariofilena, α -humulena, biciklogermakrena, miristicina, linalil acetata i dr. koji imaju značajan antioksidativni kapacitet koji svoj maksimum doseže u veljači i ožujku kada stabla masline počinju novu sezonu rasta i postaju metabolički aktivnija (Jurišić Grubešić i sur., 2021).

Ipak, antioksidativni kapacitet najviše se pripisuje fenolnoj frakciji u sastavu lista masline. Osim što su strukturno raznoliki, fenolni spojevi nalaze se u listu masline u različitim koncentracijama. Flavonoidi mogu biti prisutni u aglikonskom obliku (kvercetin, apigenin, luteolin, diosmetin, kemferol, katehin, hesperetin) ili u glikoziliranom obliku (kvercetin-7-O-rutinozid, luteolin-7-O-rutinozid, luteolin-7-O-glukozid, luteolin-4'-O-glukozid, luteolin-7,4'-O-diglukozid, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-rutinozid, kvercetin-3-O-rutinozid (rutin)). Jednostavni fenoli (npr. hidroksitirozol, tirozol, kavena, vanilinska, galna, klorogenska, p-kumarinska i ferulična kiselina) prisutni su u listovima masline u manjim količinama nego sekoiridoidi i flavonoidi. Sekoiridoidi kvantitativno predstavljaju vodeće spojeve u listu masline i porodica *Oleaceae* poznata je po njima. Istaknuti sastojak je oleuropein, odgovoran za gorak okus plodova i listova masline, a tu su još prisutni ligstrozid i oleurozid, sekoiridoidni aldehid oleacein te polifenolni glikozid verbaskozid (Clodoveo i sur., 2021; Gutiérrez-Miranda i sur., 2023).

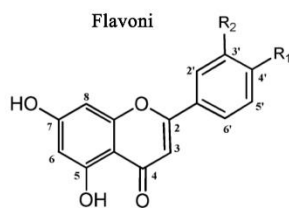
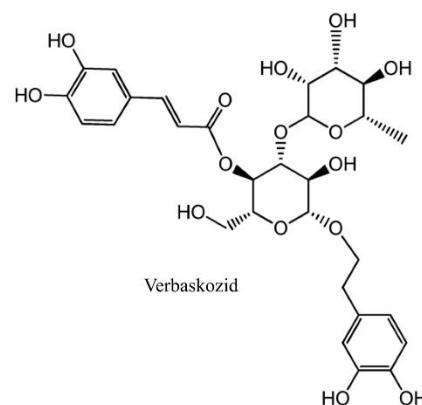
Sekoiridoidi



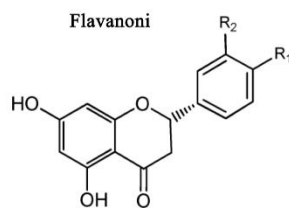
Kvercetin ($R = OH$)
 Kemferol ($R = H$)



Katehin ($R_1 = OH$, $R_2 = H$)
 Galokatehin ($R_1 = OH$, $R_2 = OH$)

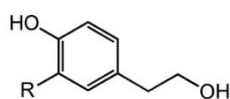


Apigenin ($R_1 = OH$, $R_2 = H$)
 Luteolin ($R_1 = OH$, $R_2 = OH$)
 Diosmetin ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$)



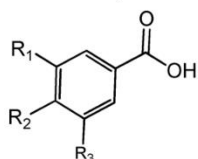
Hesperetin ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$)

Fenolni alkoholi



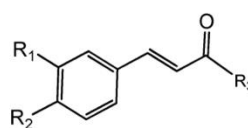
Tirozol ($R = H$)
 3-hidroksitirozol ($R = OH$)

Hidroksibenzojeve kiseline



Galna kiselina ($R_1, R_2, R_3 = OH$)
 Vanilinska kiselina ($R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = CH_3O$)

Hidroksicimetne kiseline



Kavena kiselina ($R_1, R_2, R_3 = OH$)
p-kumarinska kiselina ($R_1 = H$, $R_2, R_3 = OH$)
 Ferulična kiselina ($R_1 = CH_3O$, $R_2, R_3 = OH$)
 Klorogenska kiselina ($R_1, R_2 = OH$, $R_3 = kininska\ kiselina$)

Slika 1. Strukture fenolnih spojeva identificiranih u listu masline (preuzeto i prilagođeno prema Clodoveo i sur., 2021).

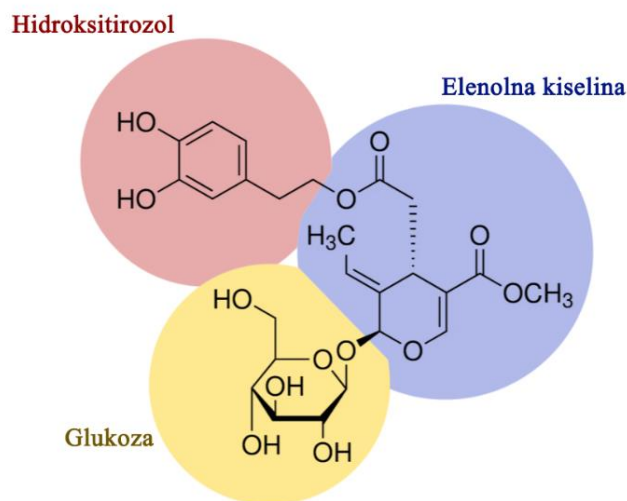
Ramírez i sur. (2022) u listu masline utvrdili su visoku aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i β -glukozidaze te nisku aktivnost esteraze u usporedbi s plodom masline.

Enzimske aktivnosti, kao i sadržaj fenola, varirale su ovisno o sezoni berbe. Najniži sadržaj

fenola odgovarao je najvećoj aktivnosti polifenol oksidaze otkrivenoj tijekom proljeća. Ostale enzimske aktivnosti također su varirale tijekom godine, ali nije uočen zajednički trend.

Sastav ekstrakta lista masline ovisi o načinu sušenja lista, o uvjetima skladištenja (temperatura, vlažnost zraka, trajanje), o načinu ekstrakcije, o uvjetima ekstrakcije (vrsta otapala, temperatura, pH, trajanje) te o samom sastavu lista masline (Markhali i sur., 2020; Ghomari i sur., 2019; Abaza i sur., 2015) koji pak ovisi o nekoliko čimbenika kao što su klimatski uvjeti, razdoblje sakupljanja, starost stabla masline i starost lista, geografsko podrijetlo te sorta, odnosno genotip sorte kao najznačajniji čimbenik (Polić Pasković i sur., 2023; Markhali i sur., 2020). Pasković i sur. (2020) određivali su fenolni i mineralni sastav lista masline četiriju hrvatskih sorti (Istarska bjelica, Oblica, Lastovka, Drobnica) i talijanske sorte Leccino. Rezultati su pokazali da Istarska bjelica ima najveći potencijal za fitokemijski uzgoj među ispitivanim sortama zbog stalno visokih koncentracija oleuropeina u njezinom listu. Koncentracija glavnih fenolnih komponenti u listu Istarske bjelice tek se neznatno mijenjala tijekom perioda uzorkovanja, što ukazuje na mogućnost veće sposobnosti otpornosti na stres i drugačijeg metaboličkog odgovora u usporedbi s drugim ispitivanim sortama (Pasković i sur., 2020).

1.2.2. Oleuropein

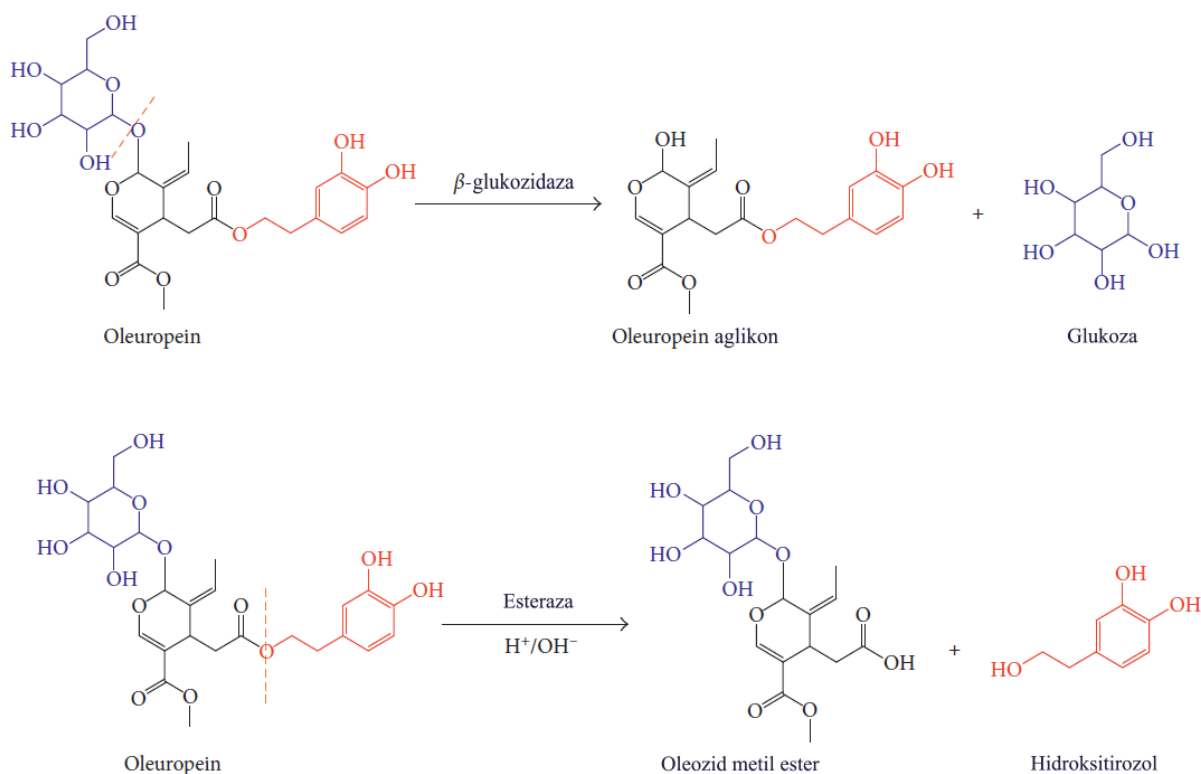


Slika 2. Kemijska struktura oleuropeina

Oleuropein se nalazi u svim dijelovima stabla masline, a posebno u listu (Rishmawi i sur., 2022). On je najzastupljeniji sastojak ekstrakta lista masline (Espeso i sur., 2021) i uvelike je odgovoran za njegove zdravstvene učinke: antimikrobne, antiviralne,

antioksidativne, protuupalne, protutumorske, hepatoprotektivne i neuroprotektivne (Barbaro i sur. 2014). Antioksidativni potencijal oleuropeina može biti posljedica njegove sposobnosti keliranja iona metala, poput bakrova i željezova iona, koji kataliziraju reakcije stvaranja slobodnih radikala, kao i sposobnost inhibicije mnogih upalnih enzima poput lipooksigenaze, bez utjecaja na put ciklooksigenaze (Espeso i sur., 2021). Oleuropein je po strukturi sekoiridoid, preciznije heterozidni ester hidroksitirozola s glikoziliranom elenolnom kiselinom (Cör Andrejč i sur., 2022).

Kako list stari, količina oleuropeina se smanjuje, dok se količina hidroksitirozola povećava zbog kemijskih i enzimskih procesa koji se odvijaju (Espeso i sur., 2021). Hidrolizu oleuropeina mogu potaknuti svjetlo, kiseline, baze, visoke temperature ili njegova razgradnja može biti posredovana enzimima (Ramírez i sur., 2022). β -glukozidaza kidat će glikozidnu vezu između glukoze i oleuropein aglikona, dok će pod utjecajem esteraze, kiseline ili baze pucati esterska veza između hidroksitirozola i elenolne kiseline u molekuli (Johnson i Mitchell, 2018). Valja spomenuti i polifenol oksidazu koja katalizira oksidaciju *o*-dihidroksifenola u *o*-kinone (De Leonardis i sur., 2015).



Slika 3. Mehanizam hidrolize oleuropeina (preuzeto i prilagođeno prema Johnson i Mitchell, 2018)

Barbaro i sur. (2014) u svojem su radu skupili podatke o sadržaju oleuropeina u različitim dijelovima masline iz različitih istraživanja. Oleuropein je nađen u listu, grančicama, korijenju, pupoljcima, cvjetovima i plodu masline. Sadržaj oleuropeina najveći je u listu masline, a ovisno o radu, kretao se od 2,1 do 134 mg po g suhog lista te u grančicama od 11 do 18,9 g po kg suhog uzorka. Razlike u metodama korištenim za analizu oleuropeina mogu objasniti varijabilnost sadržaja oleuropeina, no znamo da sadržaj oleuropeina ovisi i o mnogim drugim čimbenicima.

1.2.3. Utjecaj temperature skladištenja na sadržaj fenola

Postoji samo nekoliko znanstvenih radova koji opisuju utjecaj temperature skladištenja maslinova lista nakon što je samljeven u prah ili skladištenja suhog ekstrakta maslinova lista na sadržaj fenolnih komponenti, s naglaskom na oleuropein.

Ahmad-Qasem i sur. (2016) listove masline osušili su na vrućem zraku (120 °C) i zatim su proveli ekstrakciju fenola maceracijom etanol–voda (80:20, v/v). Potom je dio ekstrakata (A-120) osušen vrućim zrakom na 120°C, a drugi dio (V-55) vakuumski dehidriran na 55 °C. Dio iz svake skupine je ostavljen u praškastom obliku, a dio je rekonstituiran u tekući oblik korištenjem etanol-vode (80:20, v/v). Zatim su ekstrakti, u tekućem i praškastom obliku, pohranjeni na 4, 25 i 35 °C četiri tjedna. Različiti uvjeti skladištenja (temperatura i oblik ekstrakta) su jedva utjecali na ukupni sadržaj fenola (TPC) ekstrakata A-120, ali kod praškastih ekstrakata V-55 temperatura skladištenja imala je značajan učinak. Tako se TPC smanjio za 32,4% na kraju skladištenja (28. dan) na 35 °C, dok je ostao gotovo konstantan na 4 i 25 °C. Temperatura skladištenja nije značajno utjecala na sadržaj glavnih polifenolnih spojeva (oleuropein, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid) kvantificiranih u ekstraktima tijekom razdoblja skladištenja, ali je praškasti oblik V-55 ekstrakata pohranjenih na 4 °C pokazao nešto niže koncentracije navedenih spojeva od tekućeg oblika.

Feng i sur. (2021) listove sušene na zraku na 25 °C, samljeli su u prah i zatim pohranili na -20 °C, 4 °C i 25 °C tijekom devet tjedana. Sadržaj oleuropeina smanjio se u 1. tjednu, ali je od 3. do 9. tjedna pokazivao samo malu, neznatnu fluktuaciju. Sadržaj hidrositirozola povećao se u 1. tjednu i zatim pao tijekom sljedeća 2 tjedna te ostao stabilan nakon toga. Promjene u sadržaju oleuropeina i hidrositirozola bile su značajne samo u ranim fazama skladištenja te podjednake na svim trima temperaturama skladištenja, a sadržaj je općenito bio stabilan nakon toga.

Martínez-Navarro i sur. (2021) sedam su dana listove masline sušili na zraku na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim ih pohranili na sobnoj temperaturi do upotrebe. Listove

su samljeli i dobili prah koji su skladištili na dvije temperature: sobna (oko 22 °C) i 40 °C; na tri razine relativne vlažnosti zraka: 23%, 57% i 75%; i na dva uvjeta osvjetljenja: prirodno svjetlo i tama; te pratili promjene u sadržaju oleuropeina tijekom šest mjeseci skladištenja. Zaključili su da i temperatura i relativna vlažnost utječu na stabilnost sadržaja oleuropeina, dok osvjetljenje nije imalo utjecaja. Među ispitivanim uvjetima skladištenja, ono koje je najbolje spriječilo gubitak oleuropeina bilo je skladištenje praha maslinovog lista ispod 57% relativne vlažnosti zraka na sobnoj temperaturi.

Markhali i Teixeira (2024) osušili su listove na 37 °C tijekom 48 sati i zatim ih samljeli na 0,3 mm te proveli ekstrakciju na tri različita načina. Ekstrakte lista pohranili su na -20, 4 i 25 °C tijekom 8 tjedana. Skladištenje na -20 °C bilo je najprikkladnije za očuvanje ukupnih fenola u svakoj ekstrakcijskoj skupini s konačnim gubitkom od 11%, dok je na 4 °C gubitak bio 19%, a na 25 °C 27%. Koncentracije oleuropeina na 25 °C u svim ekstraktima počele su se naglo smanjivati od prvog tjedna skladištenja i brojke su nastavile značajno padati tijekom osam tjedana za oko 45% gubitka. Skladištenje na -20 °C i 4 °C izazvalo je manje štetne učinke na sadržaj oleuropeina s gubitcima 15-17%. Sadržaj hidroksitirozola u svim ekstraktima prilično je porastao nakon prvog tjedna kada se čuvao na 25 °C te nakon drugog tjedna kada se čuvao na 4 °C i -20 °C. Početni porast hidroksitirozola vjerojatno je posljedica istodobne hidrolize oleuropeina. Međutim, iako su brojevi porasli tijekom kratkotrajnog skladištenja, koncentracija hidroksitirozola je prilično pala tijekom idućih tjedana. Markhali i Teixeira (2024) zaključili su da je ekstrakte lista masline najbolje čuvati na -20 °C dok je najmanje poželjno čuvati ih na 25 °C.

1.2.4. Kemijski sastav grančice masline

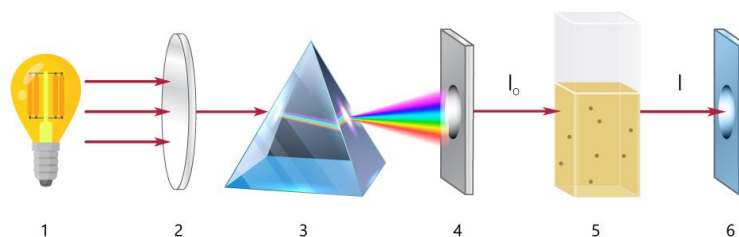
Grančice masline manje su istraživane nego list i plod, no ipak postoji nekoliko radova koji govore o njihovom kemijskom sastavu. Lo Giudice i sur. (2021) navode visoki sadržaj celuloze, hemiceluloze i lignina te kako grančice masline imaju dobru hranjivu vrijednost za doziranje i formuliranje obroka za životinje zbog svog oligosaharidnog sadržaja. Od fenolnog sastava, u grančicama trinaest španjolskih sorti maslina skupljenih u prosincu i čuvanih na 4 °C su identificirani oleuropein (1602-18856 mg/kg suhog uzorka), verbaskozid (52-1044 mg/kg suhog uzorka), hidroksitirozol (214-740 mg/kg suhog uzorka), tirozol (1201-1915 mg/kg suhog uzorka) i R-taksifolin (412-854 mg/kg suhog uzorka) (Japón-Luján i De Castro, 2007). Ortega-García i Peragón (2010) primijetili su da se tijekom procesa sazrijevanja plodova, koncentracija hidroksitirozola, tirozola i oleuropeina značajno povećala u grančicama masline prikupljenim od kolovoza do studenog. Koncentracije hidroksitirozola

kretale su se u rasponu od 1,50 do 2,12 g/kg suhog uzorka, tirozola od 1,62 do 3,74 g/kg suhog uzorka te oleuropeina od 22,30 do 58,02 g/kg suhog uzorka. Taj je trend bio suprotan onome koji pokazuju korijen i plod i djelomično se poklapao s trendom lista tijekom sazrijevanja. Kishikawa i sur. (2015) izvijestili su da etanolni ekstrakt grančica ima veći sadržaj ukupnih fenola i oleuropeina u usporedbi s ekstraktima dobivenima iz drugih dijelova stabla masline poput lista i cvijeta.

1.3. ANALITIČKE TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLA U EKSTRAKTU LISTA I GRANČICA MASLINE

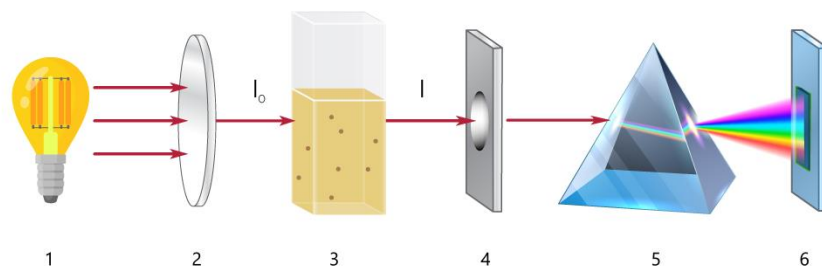
1.3.1. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija je analitička tehnika koja mjeri količinu elektromagnetskog zračenja diskretnih valnih duljina UV ili vidljive svjetlosti koje uzorak apsorbira ili propušta u usporedbi s referentnim ili slijepim uzorkom. Apsorpcija svjetlosti temelji se na prijelazu elektrona iz osnovnog u jednu od vibracijskih i rotacijskih razina pobuđenog elektronskog energetskeg stanja. Različite vrste molekula imaju različit skup energetskih razina ovisno o kemijskoj strukturi, stoga će apsorbirati svjetlost specifičnih valnih duljina pokazujući jedinstvena spektralna svojstva. Dio molekule odgovoran za apsorpciju svjetlosti u UV-Vis području naziva se kromofor (Harris, 2010). Kromofori su najčešće nezasićene organske funkcionalne skupine, no to mogu biti i skupine poput alkohola, etera, amina, amida, karboksilnih kiselina itd. (Pavia, 2009). UV-Vis spektrofotometriju stoga možemo koristiti u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi određenih uzoraka koji sadrže spojeve s kromoforima. Europska farmakopeja puna je monografija koje koriste UV-Vis spektrofotometriju za potvrdu identiteta lijekova, ispitivanje čistoće lijekova, određivanje sadržaja te određivanje fizikalno-kemijskih svojstava lijekova poput stabilnosti, topljivosti, pK_a vrijednosti i sl. Postoje mnoge varijacije UV-Vis spektrofotometra, a one glavne komponente prikazane su na Slikama 4 i 5.



1 izvor svjetlosti, 2 kolimator (leća), 3 prizma ili optička rešetka, 4 pukotina, 5 kiveta s otopinom uzorka, 6 detektor

Slika 4. Shematski prikaz monokromatskog UV-Vis spektrofotometra (<https://www.implen.de>)



1 izvor svjetlosti, 2 kolimator (leća), 3 kiveta s otopinom uzorka, 4 pukotina, 5 prizma ili optička rešetka, 6 detektor
Slika 5. Shematski prikaz polikromatskog UV-Vis spektrofotometra (<https://www.implen.de>)

Za UV-Vis tehniku, neophodan je stabilan izvor svjetlosti koji može emitirati svjetlost u širokom rasponu valnih duljina. Obično se koristi ksenonska lampa kao izvor svjetlosti visokog intenziteta za UV i vidljivi raspon. Kod instrumenata koji koriste dvije žarulje, volframova ili halogena žarulja se koristi za vidljivu svjetlost, dok je deuterijska lampa uobičajeni izvor UV svjetlosti.

U sljedećem koraku, ako se radi o monokromatskom UV-Vis spektrofotometru, iz širokog raspona valnih duljina koje emitira izvor svjetlosti, moraju se odabrati određene valne duljine koje odgovaraju vrsti uzorka i analitu. Zbog toga se u instrument najčešće ugrađuju monokromatori koji razlažu polikromatsku svjetlost na monokromatsku pomoću sustava prizmi ili optičkom (difrakcijskom) rešetkom. Frekvencija utora difrakcijske rešetke mjeri se kao broj utora po mm. Često se zajedno s monokromatorima koriste apsorpcijski, dikroični, cutoff ili pojasni filtri kako bi se dodatno suzile valne duljine svjetlosti radi preciznijih mjerenja i poboljšanja omjera signala i šuma.

Svjetlost određene valne duljine zatim dolazi do otopine s uzorkom koja se nalazi u kiveti, no prije samog mjerenja uzorka s analitom, potrebno je prvo izmjeriti slijepi uzorak, odnosno kivetu napunjenu istim otapalom koje se koristi za pripremu uzorka. Instrument zatim kasnije automatski koristi signal slijepog uzorka kako bi dobio prave vrijednosti apsorpcije analita. Za kivetu je najbolje da bude napravljena od kvarca jer je kvarc proziran za većinu UV svjetlosti. Nakon što monokromatska zraka svjetlosti prođe kroz uzorak, dolazi do detektora (<https://www.technologynetworks.com>).

Ako se radi o polikromatskom UV-Vis spektrofotometru, polikromatska zraka svjetlosti iz izvora usmjerena pomoću leće, šalje se kroz otopinu uzorka, a zatim se pomoću polikromatora razdvaja na spektar (<https://www.implen.de>).

Detektor se koristi za pretvaranje svjetlosti u čitljiv elektronički signal. Detektori se temelje na fotoelektričnim prevlakama ili na poluvodičima. Fotoelektrična prevlaka izbacuje

negativno nabijene elektrone kada je izložena svjetlu. Kada se elektroni izbace, stvara se električna struja proporcionalna intenzitetu svjetlosti. Kada su poluvodiči izloženi svjetlosti, kroz njih može proći električna struja proporcionalna intenzitetu svjetlosti. Fotodiode i uređaji povezani s nabojem (CCD) dva su najčešća detektora temeljena na tehnologiji poluvodiča. Nakon što se generira električna struja iz detektora, signal se prepoznaje i šalje na računalo ili ekran (<https://www.technologynetworks.com>).

Informacije dobivene UV-Vis spektroskopijom najčešće se prikazuju grafičkim prikazom apsorbancije na okomitoj y osi i valne duljine na vodoravnoj x osi, a taj graf se naziva apsorpcijski spektar. Intenzitet svjetlosti kvantitativno je povezan s količinom svjetlosti koju uzorak apsorbira.

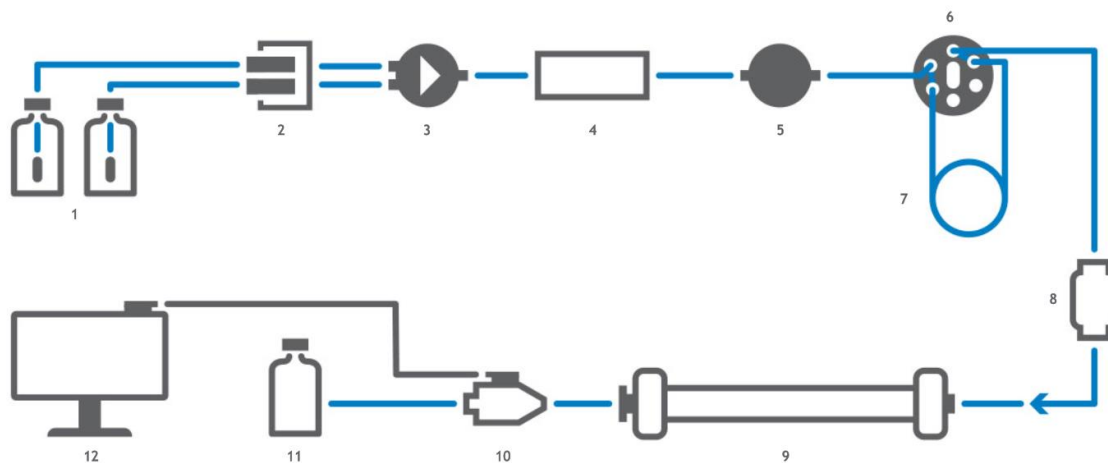
Apsorbancija (A) je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja (I_0) i propuštenog zračenja (I) kroz uzorak; $A = \log(I_0/I)$.

Apsorpcija svjetlosti kroz otopine može se matematički opisati Beer-Lambertovim zakonom $A = \epsilon bc$ gdje je A apsorbancija na danoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, b je duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm) a c je koncentracija tvari u otopini (mol L^{-1}) (Harris, 2010).

1.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, češće zvana samo engleskom kraticom HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), moćna je analitička tehnika koja se koristi za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih spojeva u različitim uzorcima. HPLC radi na principu kromatografskog odjeljivanja, gdje se uzorak otopi u tekućoj mobilnoj fazi koja pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu stacionarnom fazom. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze. Komponente uzorka različito stupaju u interakciju sa stacionarnom fazom, što dovodi do njihovog odvajanja na temelju različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Mehanizmi odjeljivanja mogu biti adsorpcija, razdioba, ionska izmjena, raspodjela prema veličini čestica te stereokemijske interakcije.

Komponente svakog HPLC sustava su: spremnici mobilne faze, sustav za obradu otapala, pumpa, injektor, predkolona, kolona, detektor te sustav za bilježenje i obradu podataka (Luterotti, 2014).



1 spremnici mobilne faze, 2-4 sustav za obradu otapala, 2 otplinjač mobilne faze, 3 gradijentni ventil, 4 komora za miješanje otapala, 5 visokotlačna pumpa, 6-7 injektor, 6 ventil za unos uzorka, 7 petlja za injektiranje uzorka, 8 predkolona, 9 analitička kolona, 10 detektor, 11 boca za sakupljanje frakcija, 12 sustav za bilježenje i obradu podataka

Slika 6. Shematski prikaz HPLC sustava (<https://www.idex-hs.com>)

Pumpa je odgovorna za isporuku mobilne faze kroz kolonu pri kontroliranoj brzini protoka. Injektor unosi uzorak u tok mobilne faze. Precizno ubrizgavanje ključno je za točne i ponovljive rezultate. Uzorak se unosi automatskim sustavom za injektiranje ("autosampler"), ili manualno mikrolitarskom špricom ("syringe"). Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Kratka predkolona ili predkolonski filter postavljaju se ispred analitičke kolone da bi je sačuvali od netopljivih i topljivih onečišćenja iz uzorka. Ova kolona je kraća od analitičke i obično punjena istim materijalom kao i analitička kolona. Analitička kolona je ključna komponenta u kojoj se odvija razdvajanje spojeva. To je mala cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, punjena punilom u obliku zrnaca koja nose tekuću stacionarnu fazu. Izbor vrste i dimenzija kolone ovisi o prirodi analita (Luterotti, 2014). Kolona je smještena u "pećnici" čija su vrata obično zatvorena kako bi kolona bila na konstantnoj temperaturi (Harris, 2010).

Odabir mobilne i stacionarne faze ključan je za postizanje optimalne separacije. Najčešći nosač stacionarne faze su vrlo čiste, sferne, mikroporozne čestice silicijevog dioksida (otapa se iznad pH 8) ili silicijevog dioksida s etilenskim mostovima (otporan na hidrolizu do pH 12) ili polimerni nosači kao što je polistiren (isto prigodan za odvajanje bazičnih spojeva pri pH 8-12). Stacionarna faza je kovalentno vezana za polimer (Harris, 2010). U kromatografiji normalnih faza na silika gel mogu biti vezane polarne skupine, npr., dioli, cijano, amino, dimetilamino ili diamino. U obrnuto faznoj kromatografiji koristi se silanizirani silika gel s vezanim alkilnim skupinama koje su u praksi najčešće $-C_{18}H_{37}$

(oktadecil) ili $-C_8H_{17}$ (oktil) čineći nepolarnu nepokretnu fazu. Dugi lanci ugljikovodikovih skupina postavljeni su međusobno paralelno, a u odnosu na površinu čestice okomito, čineći četkastu površinu. U tekućinskoj kromatografiji normalnih faza polarni spojevi se eluiraju posljednji, a u kromatografiji obrnutih faza polarni se spojevi eluiraju prvi. U kromatografiji normalnih faza, kao pokretna faza koristi se smjesa dietil etera, metilen klorida i kloroforma, a snaga ispiranja podešava se s n-heksanom. U kromatografiji obrnutih faza koristi se smjesa metanola, acetonitrila i tetrahidrofurana. HPLC metoda može biti izokratna ili gradijentna: kod izokratne se sastav mobilne faze tijekom elucije ne mijenja, ali bolje se i brže odjeljivanje postiže primjenom gradijentnog ispiranja kod kojeg se sastav mobilne faze tijekom elucije mijenja kontinuirano ili skokovito (Luterotti, 2014).

Detektori koji se koriste tijekom HPLC analize mogu biti fluorescencijski detektori, detektori indeksa loma, evaporativni detektori raspršenja svjetlosti, elektrokemijski detektori, maseni spektrometrijski detektori te UV-Vis detektori apsorbancije (Skoog, 2017). Ovi posljednji najčešće su korišteni, a primjenjuju se za analizu uzoraka u kojima spojevi imaju kromofor. Postoje tri vrste UV-Vis detektora apsorbancije. Prvi su filter-fotometri fiksne valne duljine, najjednostavniji, kao izvor svjetlosti koriste žarulje sa živinom parom, zatim optičke filtre za odabir ograničenog broja valnih duljina te fotocijevi. Drugi su spektrofotometri promjenjive valne duljine koji omogućuju praćenje na bilo kojoj valnoj duljini unutar radnog raspona detektora. Oni koriste deuterijeve i volframove žarulje kao izvore svjetlosti, zatim monokromator difrakcijske rešetke za odabir valne duljine te fotomultiplikator. Treća vrsta su DAD detektori, odnosno detektori s fotodiodnim nizom koji se sastoje od jednog ili dva niza fotodioda na silikonskom čipu postavljenom za primanje zračenja raspršenog difrakcijskom rešetkom. Elektronsko skeniranje, digitalizacija i obrada signala pomoću mikroračunala omogućuje prikupljanje i pohranjivanje 'snimki' kompletnog spektra tekućeg eluenta svakih 0,1 s. Spektri i kromatogram koji se razvija na bilo kojoj valnoj duljini mogu se prikazati na zaslonu računala u stvarnom vremenu i naknadno prikazati kao trodimenzionalni dijagram apsorbancije, valne duljine i vremena (Kealey, 2002).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Proizvodnjom maslina i maslinovog ulja nastaje mnogo otpada u obliku lišća i grančica masline, posebno nakon perioda rezidbe stabala. Kako bi se povećala profitabilnost maslinika, smanjio otpad i negativan utjecaj zbrinjavanja tog otpada na okoliš, razmatraju se mogućnosti njihova iskorištenja i potencijalne primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Poznato je da je list masline bogat polifenolima te su rađena mnoga istraživanja o povoljnom utjecaju ekstrakta lista masline na zdravlje pri čemu su primijećena njegova antimikrobna, antioksidativna, protuupalna, antidiijabetička, antiaterosklerotična, antihipertenzivna, kardioprotektivna i antitumorska svojstva. Proces sušenja biljnog materijala i uvjeti skladištenja neki su od čimbenika koji utječu na sadržaj polifenola u listu i grančicama masline.

U sklopu ovog diplomskog rada izradit će se suhi ekstrakti lista, grančice s listom te grančice bez lista masline koji su tri mjeseca prije ekstrakcije sušeni na zraku i zatim čuvani na sobnoj temperaturi i na 4 °C. Uzorci suhog biljnog materijala samljet će se te ekstrahirati etanolom na ultrazvučnoj kupelji 30 min na temperaturi ≤ 30 °C, zatim centrifugirati i upariti do suha rotacijskim uparivačem na temperaturi ≤ 40 °C. Dobiveni suhi ekstrakti koristit će se za analizu sadržaja ukupnih polifenola (TPC), *o*-difenola (*o*-DPC) i ukupnih flavonoida (TFC) UV-Vis metodom te oleuropeina (OLE) HPLC metodom. U ovom će se diplomskom radu uspoređivati sadržaj navedenih tvari u ekstraktima lista, grančice s listom te grančice bez lista masline s obzirom na dvije temperature skladištenja (na sobnoj temperaturi i na 4 °C) suhog biljnog materijala. Dobiveni rezultati bit će korisni za razumijevanje stabilnosti fenolnih spojeva masline, a posebno biomedicinski značajnog oleuropeina u suhom listu i grančici masline prilikom njihovog dugotrajnog skladištenja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Grančice masline s lišćem (*O. europaea*) sorte 'Rosinjola' (sinonim 'Rošinjola', 'Rovinježa') i 'Istarska bjelica' (sinonim 'Bianchera') prikupljene su u nekoliko vremenskih točaka tijekom rezidbe maslina od kraja ožujka do sredine svibnja 2022. u ekološkom masliniku u Južnoj Istri. Prilikom rezidbe stabla masline, jednogodišnje mladice ostavljene su dva do tri dana u masliniku na srednjoj dnevnoj temperaturi od 18 °C do najviše 29 °C. Zatim su prebačene u nadstrešnicu i držane do početka srpnja 2022. u ambijentalnim uvjetima s prosječnom dnevnom temperaturom od 24 °C do 26 °C u hladu zaštićene plastičnim mrežama. Početkom srpnja uzet je određeni dio uzoraka suhih grančica s lišćem, podijeljen u dva dijela od kojih je jedan pohranjen na sobnoj temperaturi, a drugi na 4 °C u trajanju od tri mjeseca. Biljni materijal korišten za analizu bio je mješavina gore spomenutih sorti.

3.1.2. Kemikalije

- Acetonitril (HPLC gradient grade) J. T. Baker (Griesheim, Germany)
- Aluminijev klorid heksahidrat ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Merck (Darmstadt, Germany)
- Dimetil sulfoksid (DMSO) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
- Etanol (99,8%) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
- Folin-Ciocalteuov reagens Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland)
- Metanol (HPLC gradient grade) J. T. Baker (Griesheim, Germany)
- Mravlja kiselina (LC-MS grade) Merck (Darmstadt, Germany)
- Natrijev hidroksid (NaOH) Kemika (Zagreb, Croatia)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3) Kemika (Zagreb, Croatia)
- Natrijev molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Merck (Darmstadt, Germany)
- Natrijev nitrit (NaNO_2) Merck (Darmstadt, Germany)
- Oleuropein standard Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
- Redestilirana voda - ultra čista voda dobivena WaterPro sustavom za vodu Labconco (Kansas City, MI, SAD) s otporom od 18,2 M Ω cm (25 °C)

3.1.3. Instrumenti i pribor

- Laboratorijske čaše
- Okrugle tikvice od 100 mL
- Menzura od 50 mL
- Odmjerne tikvice od 10 mL
- Odmjerne tikvice od 5 mL
- Kvarcne kivete QS 10,0 mm, Helma
- Plastična šprica od 2 mL
- CHROMAFIL® Xtra PTFE 0,20 filtar
- Membranski filter od 0,45 µm promjera 47 mm (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- PES Syringe Filter, promjera 25 mm, veličine pora 0,22 µm (FilterBio® Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska)
- Centrifugirke
- Eppendorf tube od 1,5 mL
- Nastavci za mikropipete
- Eppendorf mikropipete od 100, 200 i 1000 µL
- Termometar
- Štoperica
- Analitička vaga Mettler Toledo XPR226 DeltaRange®
- Centrifuga Hettich centrifuge D-78532, Tuttlingen, Njemačka
- Vortex 2 tvrtke IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany)
- Ultrazvučna kupelj Elma Transonic T570 HF = 320 W, Njemačka
- Rotacijski uparivač Büchi Heating Bath B-490, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska
- UV-Vis spektrofotometar Hewlett Packard 8453
- kromatografska kolona Ultra Aqueous C18 (4,6 × 250 mm, veličina čestica 5 µm; Restek, Bellefonte, PA, SAD)
- UHPLC sustav Agilent 1260 serije s DAD detektorom tvrtke Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- OpenLab ChemStation tvrtke Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Računalo

3.2. METODE

3.2.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija primijenjena je za sve uzorke koji su se analizirali UV-Vis i HPLC metodom. Priprema ekstrakta fenolnih spojeva provedena je prema proceduri opisanoj u radu Amidžić i sur. (2018). Korišteno je šest vrsta uzoraka: list masline, grančica s listom i grančica bez lista čuvani tri mjeseca na sobnoj temperaturi te list masline, grančica s listom i grančica bez lista čuvani tri mjeseca na 4 °C. Uzorci su prije ekstrakcije samljeveni na veličinu od 0,5 mm. Za potrebe ekstrakcije u okruglu tikvicu od 100 mL izvagano je 4 g uzorka te dodano 50 mL etanola ($\geq 99,8\%$). Mase uzoraka grančice s listom i grančice bez lista čuvane na 4 °C bile su nešto manje zbog manje količine uzorka stoga je i volumen etanola proporcionalno prilagođen. Otvor tikvice prekriven je aluminijskom folijom te je smjesa ekstrahirana na ultrazvučnoj kupelji 30 min. Temperatura vode u kupelji je praćena termometrom i rashlađivana dodavanjem hladne vode kako bi održali temperaturu na ≤ 30 °C. Sadržaj tikvice je potom podijeljen u dvije epruvete za centrifugiranje te centrifugiran 30 minuta na 4000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je prenesen u čistu okruglu tikvicu te uparen do suha pomoću rotacijskog uparivača na temperaturi ≤ 40 °C. Dobiven je zeleni suhi prah (suhi ekstrakt) koji se čuva zaštićen od svjetlosti na 4 °C.

3.2.2. UV-Vis spektrofotometrijske analize fenola

3.2.2.1. Priprema otopina uzoraka za spektrofotometrijsku UV-Vis analizu

Na analitičkoj vagi izvagano je oko 5 mg suhog ekstrakta, pripremljenog prema postupku opisanom u dijelu 3.2.1., u Eppendorf tubu u koju je potom pipetirano 1 mL metanola. Tako priređeni metanolni ekstrakt je filtriran pomoću šprice kroz filter pora veličine 0,2 μm (CHROMAFIL® Xtra PTFE 0,20 filter) u drugu čistu Eppendorf tubu. Dobivena je bistra zelenkasta otopina.

3.2.2.2. Priprema otopina reagensa za spektrofotometrijsku UV-Vis analizu

20%-tna otopina Na_2CO_3 : pripremljena je vaganjem 5,00 g natrijevog karbonata u odmjernoj tikvici od 25 mL te nadopunjena redestiliranom vodom do oznake i miješana dok se svi kristali nisu otopili.

Metanol : voda = 1:1 v/v pripremljena je miješanjem jednakih volumena MeOH i redestilirane vode.

5% otopina Na_2MoO_4 : pripremljena je vaganjem 0,25 g natrijevog molibdata u odmjernoj tikvici od 5 mL te je do oznake nadopunjena 50%-tnim metanolom. Otapalo je dodavano postupno uz snažno i dugotrajno miješanje zbog slabe topljivosti spoja.

5%-tna otopina NaNO_2 : pripremljena je vaganjem 0,25 g natrijevog nitrita u odmjernoj tikvici od 5 mL te nadopunjena redestiliranom vodom do oznake.

10%-tna otopina AlCl_3 : pripremljena je vaganjem 0,91 g aluminijskog klorida u odmjernoj tikvici od 5 mL te nadopunjena redestiliranom vodom do oznake. Voda je dodavana postupno uz miješanje, a tikvica se hladila pod mlazom vode.

3.2.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određuje se Folin-Ciocalteu (F-C) kolorimetrijskom metodom prema Gutfingeru (1981).

U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirano je 0,1 mL prethodno pripremljenog metanolnog ekstrakta te 5 mL redestilirane vode. U istu je tikvicu otpipetirano 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa nakon čega je sadržaj u tikvici miješan 3 minute. Po isteku 3 minute otpipetirano je 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata i nadopunjeno redestiliranom vodom do oznake, zatvoreno čepom i snažno promućkano. Tako pripremljena otopina čuvana je na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon sat vremena, mjerena je apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 725 nm. Sva mjerenja su izvedena u duplikatu.

Iz jednadžbe baždarnog pravca je na temelju izmjerene apsorbancije određena koncentracija ukupnih fenola u ispitivanom metanolnom ekstraktu. Spomenuti baždarni pravac pripremljen je u prethodnim istraživanjima u laboratoriju Zavoda za fizikalnu kemiju, a korištena je otopina standarda galne kiseline u rasponu koncentracija 0,001 do 0,006 mol/L. Procedura je bila ista kao i gore opisana procedura određivanja ukupnih fenola. Dobivena je

jednadžba pravca $y = 141,73 \text{ L mol}^{-1} x + 0,0219$ pri čemu je x koncentracija uzorka (mol L^{-1}), a y izmjerena apsorbancija uzorka. Koncentracija ukupnih fenola u suhom ekstraktu je preračunata iz dobivene vrijednosti koncentracije fenola u metanolnom ekstraktu uzimajući u obzir uzetu masu suhog ekstrakta te volumen metanola u kojem je otopljen suhi ekstrakt. Rezultati su iskazani kao ekvivalenti galne kiseline po masi suhog ekstrakta (mg GAE/g DE). Uzimajući u obzir masu suhog biljnog materijala korištenog za ekstrakciju, rezultati su prikazani i kao ekvivalenti galne kiseline po masi suhog biljnog uzorka (mg GAE/g DW).

3.2.2.4. Određivanje *o*-difenola

Sadržaj *o*-difenola određen je spektrofotometrijski na 370 nm prema Mateos i sur. (2001).

U odmjernoj tikvici od 5 mL pripremljena je ispitivana otopina miješanjem 5 mL otapala metanol:voda = 1:1 (v/v) te 0,2 mL metanolnog ekstrakta.

A) U kivetu je dodano 2 mL prethodno pripremljene ispitivane otopine te 0,5 mL 5%-tne otopine Na_2MoO_4 . Sadržaj je pomiješan te ostavljen stajati u mraku na sobnoj temperaturi 15 minuta nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 370 nm, $A(U)$. Postupak je izvođen u duplikatu.

B) U kivetu je dodano 2 mL ispitivane otopine te 0,5 mL 50%-tne otopine metanola. Sadržaj je pomiješan i ostavljen stajati u mraku 15 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 370 nm, $A(B)$. Postupak je izvođen u duplikatu.

$A(U-B)$ dobiven je slijedećim računom: $A(U-B) = A(U) - A(B)$

i predstavlja razliku apsorbancija dobivenih mjerenjima pod A) i B).

Sadržaj *o*-difenola u metanolnom ekstraktu je određen na temelju apsorbancije $A(U-B)$ uz pomoć baždarnog pravca koji je pripremljen u prethodnim istraživanjima u laboratoriju Zavoda za fizikalnu kemiju uz pomoć otopina standarda galne kiseline u rasponu koncentracija 0,0005 do 0,008 mol/L. Procedura je bila ista kao i gore opisana procedura određivanja *o*-difenola. Dobivena je jednadžba pravca $y = 141,43 \text{ L mol}^{-1} x - 0,022$ pri čemu je x koncentracija uzorka (mol L^{-1}), a y izmjerena apsorbancija uzorka. Sadržaj *o*-difenola u suhom ekstraktu je preračunat iz dobivene vrijednosti koncentracije *o*-difenola u metanolnom ekstraktu uzimajući u obzir uzetu masu suhog ekstrakta te volumen metanola u kojem je

otopljen suhi ekstrakt. Rezultati su iskazani kao ekvivalenti galne kiseline po masi suhog ekstrakta (mg GAE/g DE). Uzimajući u obzir masu suhog biljnog materijala korištenog za ekstrakciju, rezultati su prikazani i kao ekvivalenti galne kiseline po masi suhog biljnog uzorka (mg GAE/g DW).

3.2.2.5. Određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određuje se prema spektrofotometrijskom ispitivanju koje su opisali Kim i sur. (2003).

A) U odmjernu tikvicu od 10 mL dodano je 4 mL redestilirane vode te odgovarajući alikvot metanolnog ekstrakta razrijeđen do 1 mL s vodom (0,2 mL metanolnog ekstrakta i 0,8 mL redestilirane vode). U trenutku dodavanja 0,3 mL 5%-tne otopine NaNO₂ uključena je štoperica (t=0 min). Po isteku 5. minute (t=5 min) dodano je 0,3 mL 10%-tne otopine AlCl₃ te je nakon jedne minute (t=6 min) dodano 2 mL 1 mol dm⁻³ otopine natrijevog hidroksida, a tikvica je nadopunjena redestiliranom vodom do oznake i dobro promiješana (t'=0 min). Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 510 i 700 nm 30 sekundi (t'=0,5 min) te dvije minute nakon što je promiješan sadržaj (t'=2 min).

B) Isti postupak je proveden s 1 mL redestilirane vode umjesto razrijeđene otopine metanolnog ekstrakta. Mjerenja su izvedena u duplikatu.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanom metanolnom ekstraktu određen je uz pomoć baždarnog pravca na temelju apsorbancije A dobivene sljedećim računom:

$$A(A) = A(A)_{510} - A(A)_{700}$$

$$A(B) = A(B)_{510} - A(B)_{700}$$

$$A = A(A) - A(B)$$

U računu su korištene apsorbancije izmjerene 30 sekundi nakon mućkanja otopine (t'=0,5min). Apsorbancija je mjerena i nakon 2 minute (t'=2 min) kako bi se utvrdilo da je reakcija završena.

Baždarni pravac je pripremljen u prethodnim istraživanjima u laboratoriju Zavoda za fizikalnu kemiju uz pomoć otopina standarda katehina u koncentracijskom rasponu od 20 do 100 µg/mL. Procedura je bila ista kao i gore opisana procedura određivanja ukupnih

flavonoida. Dobivena je jednadžba baždarnog pravca $y = 0,003608 \text{ L mg}^{-1} x - 0,001203$ gdje je x koncentracija uzorka (mg L^{-1}), a y izmjerena apsorbanacija uzorka. Sadržaj ukupnih flavonoida u suhom ekstraktu preračunat je iz dobivene vrijednosti koncentracije ukupnih flavonoida u metanolnom ekstraktu uzimajući u obzir uzetu masu suhog ekstrakta te volumen metanola u kojem je otopljen suhi ekstrakt. Rezultati su iskazani kao ekvivalenti katehina po masi suhog ekstrakta (mg CE/g DE). Uzimajući u obzir masu suhog biljnog materijala korištenog za ekstrakciju, rezultati su zatim prikazani i kao ekvivalenti katehina po masi suhog biljnog uzorka (mg CE/g DW).

3.2.3. HPLC analiza sadržaja oleuropeina

3.2.3.1. Priprema otopina uzoraka

Uzorci su pripremljeni otapanjem 10 mg suhog ekstrakta u 2 mL metanola. Uzorci su filtrirani kroz PES Syringe Filter, promjera 25 mm, veličine pora 0,22 μm (FilterBio® Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska).

3.2.3.2. Priprema otopine oleuropeina

Osnovna otopina standarda oleuropeina (100 $\mu\text{g/mL}$) pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine analitičkog standarda u metanolu. Daljnjim razrjeđivanjem osnovne otopine metanolom dobiven je niz standardnih radnih otopina u koncentraciji od 20 - 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.3.3. Priprema mobilne faze

Pripremljene su dvije mobilne faze:

Mobilna faza A = ultra čista voda : acetonitril (99:1, v/v)

Mobilna faza B = acetonitril : ultra čista voda (99:1, v/v)

Obje mobilne faze filtrirane su kroz membranski filter od 0,45 μm promjera 47 mm (Sartorius, Goettingen, Njemačka) i zakiseljene su mravljom kiselinom (0,1%).

3.2.3.4. Kromatografski uvjeti

Određivanje oleuropeina provedeno je na UHPLC sustavu Agilent 1260 serije s obrnuto faznom kromatografskom kolonom Ultra Aqueous C18 dimenzija 4,6 \times 250 mm te veličine zrnaca 5 μm . Radna temperatura bila je $30,0 \pm 0,1$ °C. Brzina protoka mobilne faze iznosila je 1,0 mL/min. Metoda je bila gradijentna, odnosno sastav mobilne faze mijenjao se

tijekom analize, tako što su se u različitim omjerima miješale mobilne faze A i B (0-30 min 0-30% B; 30-35 min 30% B; 35-40 min 30-100% B). Nakon svakog ciklusa, kolona je ekvilibrirana sa 100% mobilne faze A tijekom 5 minuta. Volumen injekcije svakog uzorka bio je 10 μ L. Kako bi se izbjegla kontaminacija prethodnim uzorkom, štrcaljka i ventil automatskog sustava za injektiranje postavljeni su tako da se isperu nakon svake injekcije metanolom. DAD kvantifikacija je izvedena na 280 nm s prorezom od 4 nm. Apsorbancija analita tijekom kromatografskog ciklusa prikupljena je u spektralnom rasponu od 200 – 400 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu pripremljeni su suhi ekstrakti od na zraku osušenih listova, grančica s listovima i grančica bez listova masline *Olea europaea* L., autohtonih hrvatskih sorti Rosinjola i Istarska bjelica te je UV-Vis metodom analiziran njihov sadržaj TPC, *o*-DPC i TFC, a HPLC-DAD metodom sadržaj OLE. Rezultati su prikazani u mg tvari po g suhog ekstrakta (DE) kako bi se procijenila kvaliteta svakog ekstrakta, te u mg tvari po g suhog biljnog uzorka (DW) kako bi se omogućila usporedba različitih dijelova biljke masline s obzirom na sadržaj fenola.

4.1. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva lista i grančice masline

U Tablici 1 prikazane su mase suhих usitnjenih uzoraka listova masline i grančica s i bez listova, volumeni etanola korišteni za pripravu suhих ekstrakata, mase dobivenih suhих ekstrakata te iskorištenje ekstrakcije.

Tablica 1. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija fenolnih spojeva iz suhih listova i grančica masline.

Temperatura skladištenja	Uzorak	Masa uzorka m_u [g]	Volumen etanola [mL]	Masa dobivenog suhog ekstrakta m_{se} [g]	Iskorištenje ekstrakcije [%]	Naziv suhog ekstrakta
Sobna temp.	List	4,00	50	0,328	8,20	LE-ST
	Grančica s listom	4,02	50	0,270	6,72	GLE-ST
	Grančica bez lista	4,01	50	0,150	3,74	GE-ST
4 °C	List	4,00	50	0,376	9,40	LE-4°C
	Grančica s listom	3,54	44	0,156	4,41	GLE-4°C
	Grančica bez lista	2,48	31	0,089	3,59	GE-4°C

LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C

Iskorištenje ekstrakcije pokazalo se najvećim u uzorcima lista masline (8,20 i 9,40%) te mnogo manjim u uzorcima grančice bez lista (3,74 i 3,59%). Iskorištenje ekstrakcije u uzorcima grančice s listom iznosilo je 6,72 i 4,41% i vjerojatno je ovisilo o udjelu listova i grančica u uzorcima, no taj parametar nije bio strogo kontroliran u ovome radu.



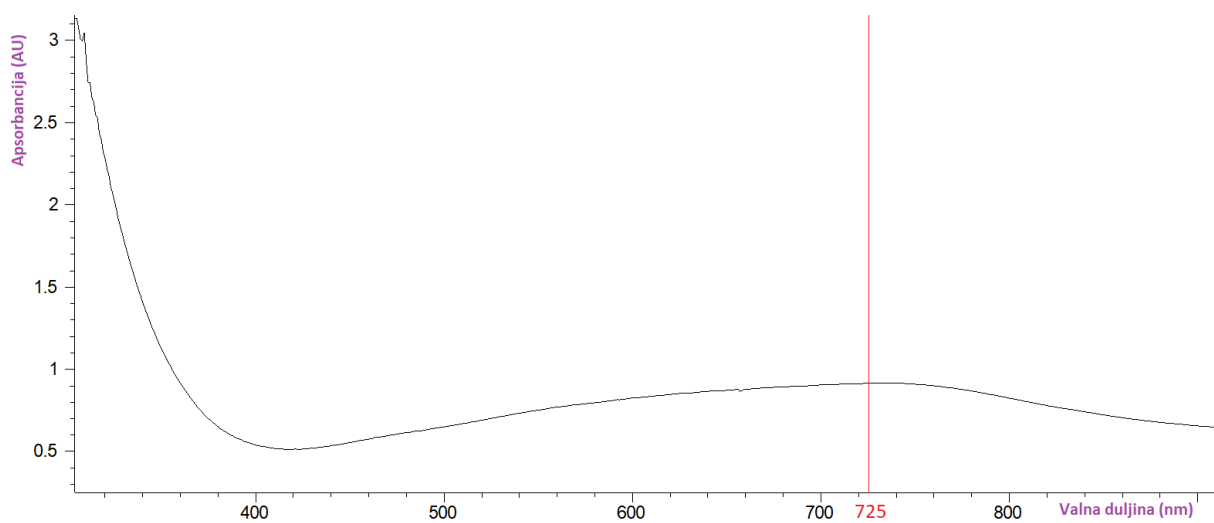
Slika 7. Redom s lijeva na desno: tekući ekstrakt lista masline LE-4°C, tekući ekstrakt grančice masline bez lista GE-4°C, tekući ekstrakt grančice maslina s listom GLE-4°C, suhi ekstrakt lista masline LE-ST.

4.2. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE ANALIZE

4.2.1. Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) u ispitivanim uzorcima određen je na temelju vrijednosti izmjerenih apsorbancija metanolnog ekstrakta korištenjem ranije pripremljenog baždarnog pravca standarda galne kiseline jednadžbe $y = 141,73 \text{ L mol}^{-1} x + 0,0219$ pri čemu je x koncentracija uzorka (mol/L), a y izmjerena apsorbancija uzorka.

5 mg (m_{DE}) suhog ekstrakta otopljeno je u 1,00 mL (V_{MeOH}) metanola te je dobiveni tekući ekstrakt korišten za određivanje sadržaja ukupnih fenola F-C metodom.



Slika 8. UV-Vis apsorpcijski spektar ekstrakta LE-4°C korišten za određivanje ukupnih fenola F-C metodom.

Tablica 2. Ukupni fenoli u uzorcima suhих ekstrakata lista i grančice masline određeni F-C metodom.

Naziv suhog ekstrakta	A na 725 nm	γ [mg/mL]	TPC [mg GAE/g DE]	$\overline{\text{TPC}} \pm \text{SD}$ [mg GAE/g DE]	RSD [%]	$\overline{\text{TPC}} \pm \text{SD}$ [mg GAE/g DW]
LE-ST	0,609	0,705	139	132 \pm 10	7,5	10,8 \pm 0,8
	0,550	0,633	125			
GLE-ST	0,517	0,594	119	122 \pm 5	3,8	8,20 \pm 0,31
	0,544	0,627	125			
GE-ST	0,784	0,915	175	183 \pm 11	6,0	6,84 \pm 0,41
	0,852	0,996	190			
LE-4°C	0,669	0,777	142	150 \pm 12	8,3	14,1 \pm 1,2
	0,750	0,874	159			
GLE-4°C	0,666	0,774	149	157 \pm 11	7,0	6,92 \pm 0,48
	0,733	0,854	165			
GE-4°C	0,885	1,04	190	193 \pm 4	1,9	6,89 \pm 0,13
	0,908	1,06	195			

A – apsorbanacija; γ – masena koncentracija ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline; TPC – ukupni sadržaj fenola; GAE – ekvivalent galne kiseline; DE – masa suhog ekstrakta; DW – masa suhog biljnog uzorka; SD – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija; LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C

$$M_r(\text{galna kis.}) = 170,12 \text{ g/mol}$$

$$\gamma[\text{mg/mL}] = \frac{A-0,0219}{141,73 \text{ L/mol}} \cdot 170,12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\text{TPC [mg GAE/g DE]} = \frac{\gamma[\text{mg/mL}] \cdot V_{\text{MeOH}}[\text{mL}]}{m_{\text{DE}} [\text{g}]}$$

$$\text{TPC [mg GAE/g DW]} = \frac{m_{\text{se}}}{m_{\text{u}}} \cdot \text{TPC [mg GAE/g DE]}$$

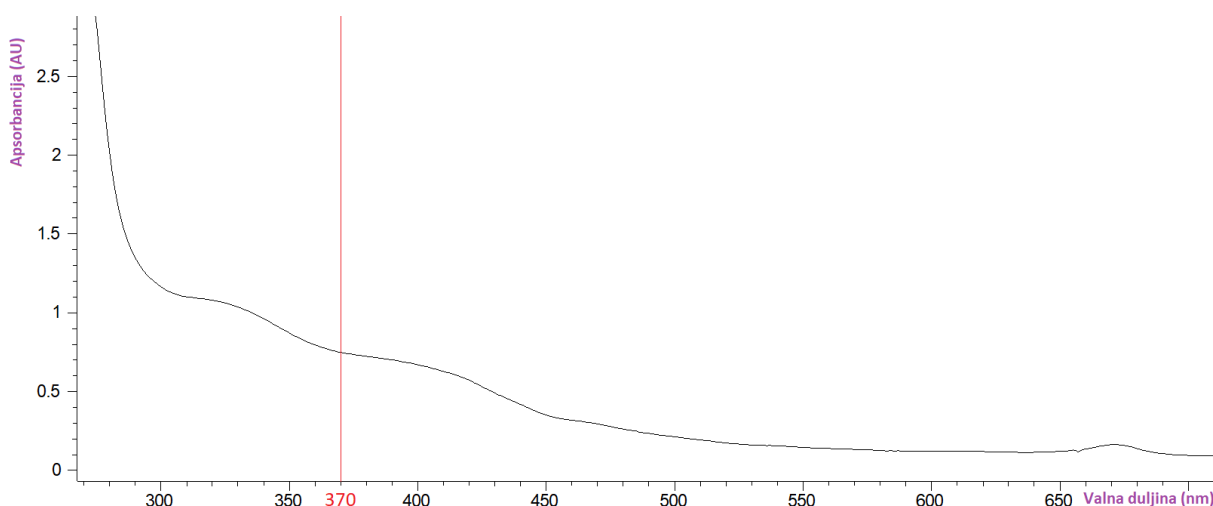
Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 2 pokazuju da je TPC najveći u GE (183 mg GAE/g DE (ST) i 193 mg GAE/g DE (4 °C)), dok je u LE i GLE manji s vrijednostima od 132 i 150 mg GAE/g DE za LE na ST i 4 °C te 122 i 157 mg GAE/g DE za GLE na ST i 4 °C. Ovi rezultati pokazuju da je GE najbogatiji fenolnim spojevima, međutim kada rezultate izrazimo po masi suhog biljnog uzorka (DW), najveći TPC sadržaj pokazuje list masline, zatim grančica s listom i naposljetku grančica bez lista, u iznosima od 10,8, 8,20 i 6,84 mg GAE/g DW na ST te vrijednostima od 14,1, 6,92 i 6,89 mg GAE/g DW na 4 °C. Isti su

fenomen za GE i LE pokazali Kishikawa i sur. (2015) s TPC vrijednostima vrlo sličnim našima. Poznavajući iskorištenje ekstrakcije iz Tablice 1, koje je kod uzorka lista bilo puno veće nego kod uzorka grančice bez lista, a gledajući rezultate iz Tablice 2, zaključujemo da smo iz uzorka grančice bez lista dobili manju količinu ekstrakta, ali on je bio bogatiji fenolima od ekstrakta lista. Osim što je sadržaj fenola različit u različitim dijelovima biljke, sam biljni materijal i metoda ekstrakcije uvelike utječu na prinos ekstrakcije, čistoću i sadržaj ekstrakta.

Giacometti i sur. (2021) u svojoj su studiji na sorti Rosinjola utvrdili TPC vrijednosti u listu od 68,89 mg GAE/g DW što je značajno više od naših rezultata. Nicoli i sur. (2019) odredili su TPC u listovima 15 talijanskih kultivara maslina u rasponu od 11,39 do 49,62 mg GAE/g DW, a M'Rabet i sur. (2023) iz lišća tuniške masline pripremili su ekstrakt čija je TPC vrijednost iznosila 134,73 mg GAE/g DE što je vrlo slično našim rezultatima.

4.2.2. Sadržaj *o*-difenola

Sadržaj *o*-difenola (*o*-DPC) određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem ranije pripremljenog baždarnog pravca standarda galne kiseline jednadžbe $y = 141,43 L mol^{-1} x - 0,022$ gdje je x koncentracija uzorka (mol/L), a y izmjerena apsorbancija uzorka. 5 mg (m_{DE}) suhog ekstrakta otopljeno je u 1,00 mL (V_{MeOH}) metanola te je dobiveni tekući ekstrakt korišten za određivanje sadržaja ukupnih *o*-difenola.



Slika 9. UV-Vis apsorpcijski spektar ekstrakta LE-4°C korišten za određivanje sadržaja *o*-difenola.

Tablica 3. *o*-difenoli u uzorcima suhих ekstrakata lista i grančice masline.

Naziv suhog ekstrakta	A na 370 nm	γ [mg/mL]	<i>o</i> -DPC [mg GAE/g DE]	$\overline{o\text{-DPC}} \pm SD$ [mg GAE/g DE]	RSD [%]	$\overline{o\text{-DPC}} \pm SD$ [mg GAE/g DW]
LE-ST	0,186	0,625	117	117 ± 0	0,0	9,55 ± 0,00
	0,186	0,624	117			
GLE-ST	0,242	0,795	150	136 ± 21	15	9,12 ± 1,46
	0,191	0,641	121			
GE-ST	0,229	0,756	137	141 ± 6	4,3	5,26 ± 0,22
	0,244	0,800	145			
LE-4°C	0,296	0,956	165	150 ± 21	14	14,1 ± 2,00
	0,230	0,758	136			
GLE-4°C	0,258	0,842	154	133 ± 29	22	5,87 ± 1,34
	0,184	0,619	113			
GE-4°C	0,257	0,840	146	137 ± 13	9,5	4,89 ± 0,49
	0,222	0,735	128			

A – apsorbanacija; γ – masena koncentracija *o*-difenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline; *o*-DPC – ukupni sadržaj *o*-difenola; GAE – ekvivalent galne kiseline; DE – masa suhog ekstrakta; DW – masa suhog biljnog uzorka; SD – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija; LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C

$$M_r(\text{galna kis.}) = 170,12 \text{ g/mol}$$

$$\gamma[\text{mg/mL}] = \frac{A-0,022}{141,43 \text{ L/mol}} \cdot \frac{500}{200} \cdot 170,12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$o\text{-DPC} [\text{mg GAE/g DE}] = \frac{\gamma[\text{mg/mL}] \cdot V_{\text{MeOH}}[\text{mL}]}{m_{\text{DE}} [\text{g}]}$$

$$o\text{-DPC} [\text{mg GAE/g DW}] = \frac{m_{\text{se}}}{m_{\text{u}}} \cdot o\text{-DPC} [\text{mg GAE/g DE}]$$

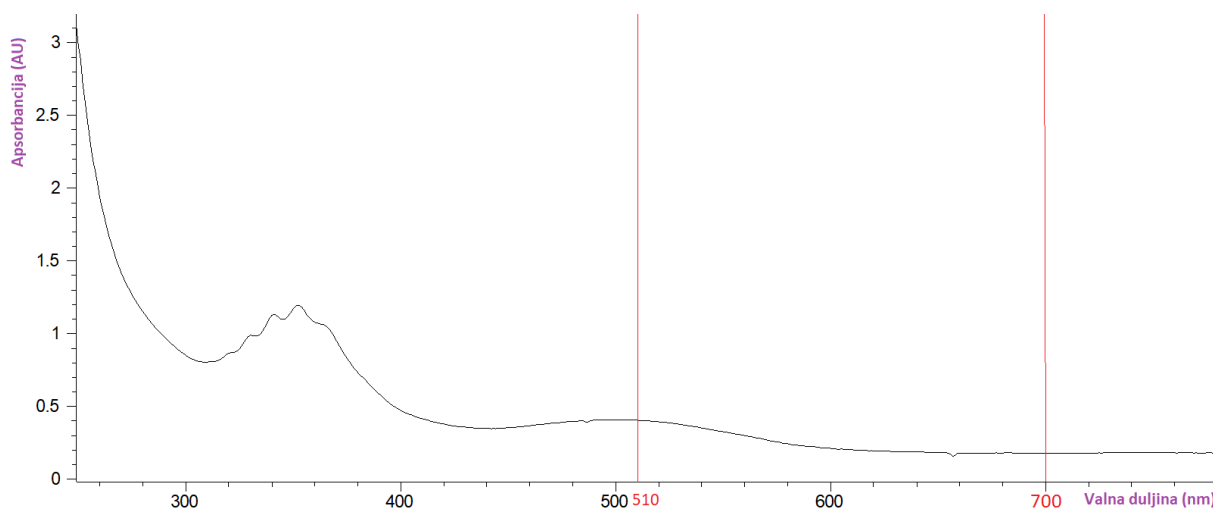
Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 3 pokazuju da je *o*-DPC za uzorke na ST najveći u GE 141 mg GAE/g DE, dok je u GLE i LE manji s vrijednostima od 136 i 117 mg GAE/g DE. Za uzorke čuvane na 4 °C rezultati pokazuju najveći sadržaj *o*-DPC u LE od 150 mg GAE/g DE, dok je u GLE i GE manji s vrijednostima od 133 i 137 mg GAE/g DE. Kada rezultate izrazimo po masi suhog biljnog uzorka (DW), najveći *o*-DPC sadržaj pokazuje list masline, zatim grančica s listom i naposljetku grančica bez lista, u iznosima od 9,55, 9,12 i 5,26 mg GAE/g DW na ST te vrijednostima od 14,1, 5,87 i 4,89 mg GAE/g DW na 4 °C.

Abdeljelil i sur. (2017) pokazali su sadržaj *o*-DPC u listovima masline prikupljenima u različitim dijelovima godine u rasponu od 6,57 do 10,87 mg GAE/g svježih listova.

4.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) određen je spektrofotometrijskom metodom na temelju izmjerenih apsorbancija metanolnih ekstrakata ispitivanih uzoraka nakon 30 sekundi mjerenja uz pomoć baždarnog pravca standarda katehina jednadžbe $y = 0,003608 L \text{ mg}^{-1} x - 0,001203$ gdje je x koncentracija uzorka (mg/L), a y izmjerena apsorbancija uzorka.

5 mg (m_{DE}) suhog ekstrakta otopljeno je u 1,00 mL (V_{MeOH}) metanola te je dobiveni tekući ekstrakt korišten za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.



Slika 10. Uv-Vis apsorpcijski spektar ekstrakta LE-4°C korišten za određivanje ukupnih flavonoida.

Tablica 4. Ukupni flavonoidi u uzorcima suhих ekstrakata lista i grančice masline.

Naziv suhog ekstrakta	A na 725 nm	γ [$\mu\text{g/mL}$]	TFC [mg CE/g DE]	$\overline{\text{TFC}} \pm \text{SD}$ [mg CE/g DE]	RSD [%]	$\overline{\text{TFC}} \pm \text{SD}$ [mg CE/g DW]
LE-ST	0,220	307	60,6	$58,2 \pm 3,3$	5,76	$4,77 \pm 0,27$
	0,210	293	55,8			
GLE-ST	0,193	269	53,8	$54,1 \pm 0,4$	0,83	$3,64 \pm 0,03$
	0,191	266	54,5			
GE-ST	0,260	362	69,1	$74,3 \pm 7,3$	9,84	$2,78 \pm 0,27$
	0,272	378	79,5			
LE-4°C	0,226	314	59,6	$63,7 \pm 5,8$	9,04	$5,99 \pm 0,54$
	0,288	401	67,8			
GLE-4°C	0,212	295	57,7	$65,1 \pm 7,4$	11,3	$2,87 \pm 0,32$
	0,239	333	65,1			
	0,284	395	72,5			
GE-4°C	0,256	357	71,6	$82,9 \pm 12,2$	14,7	$2,96 \pm 0,44$
	0,291	405	81,3			
	0,323	450	95,8			

A – apsorbancija; γ – masena koncentracija ukupnih flavonoida izraženih kao ekvivalenti katehina; TFC – ukupni sadržaj flavonoida; CE – ekvivalent katehina; DE – masa suhog ekstrakta; DW – masa suhog biljnog uzorka; SD – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija; LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C

$$\gamma[\mu\text{g/mL}] = \frac{A + 0,001203}{0,003608 \text{ L/mg}} \cdot \frac{1000}{200}$$

$$\text{TFC [mg CE/g DE]} = \frac{\gamma[\mu\text{g/mL}] \cdot V_{\text{MeOH}}[\text{mL}]}{m_{\text{DE}} [\text{mg}]}$$

$$\text{TFC [mg CE/g DW]} = \frac{m_{\text{se}}}{m_{\text{u}}} \cdot \text{TFC [mg CE/g DE]}$$

Promatranjem rezultata za TFC prikazanih u Tablici 4, uočavamo slične trendove kao i u slučaju TPC u pogledu izražavanja sadržaja po DE ili DW, odnosno vidimo da je GE najbogatiji flavonoidima (74,3 mg CE/g DE na ST i 82,9 mg CE/g DE na 4 °C), dok je sadržaj flavonoida veći u listu (4,77 mg CE/g DW na ST i 5,99 mg CE/g DE na 4 °C) u usporedbi s grančicom masline.

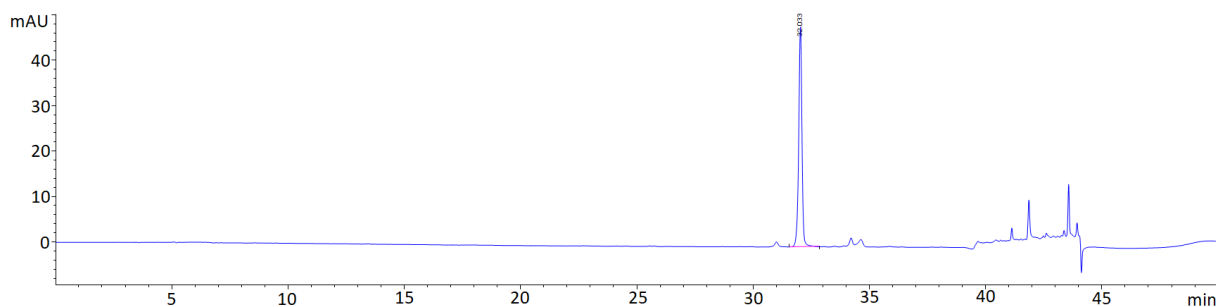
TFC se u literaturi obično izražava kao mg ekvivalenta rutina ili kvercetina (RE ili QE), dok su u našem istraživanju korišteni katehinski ekvivalenti (CE), pa se ne može napraviti izravna usporedba rezultata, ali zbog sličnosti struktura i molarnih masa katehina i

kvercetina te uz pretpostavku o njihovoj sličnoj reaktivnosti u spektrofotometrijskom testu (Kim i sur., 2003.) vrijednosti se mogu barem približno usporediti. TFC vrijednosti koje smo odredili u LE iznose 58,2 (ST) i 63,7 (4 °C) mg CE/g DE što je u skladu s vrijednosti od 62,48 mg QE/g DE koju su odredili M'Rabet i sur. (2023) u liofiliziranom ekstraktu lista masline. Naše vrijednosti TFC u samom listu masline od 4,77 (ST) i 5,99 (4 °C) mg CE/g DW, značajno su niže od onih u istraživanju Putnik i sur. (2017) koje su iznosile od 11,80 do 26,52 mg QE/g DW. Mogući razlog je što njihovi uzorci nisu bili skladišteni već neposredno obrađeni te su proveli različit način ekstrakcije. S druge su strane naše vrijednosti TFC veće od rezultata koje su dobili Moudache i sur. (2020) u iznosu od 1,05 mg QE/g DW te Brahmi i sur. (2012) u rasponu od 1,3 do 1,8 mg QE/g DW što stavlja naše TFC vrijednosti negdje u sredinu i potvrđuje da čak i nakon dugotrajnog skladištenja, koncentracije flavonoida u listu masline još uvijek mogu biti značajne. Štoviše, ni vrijednosti TFC u grančicama s listom i bez lista masline nisu bile daleko od onih u listu, no ovaj rezultat nije bilo moguće usporediti zbog manjka literaturnih podataka o sadržaju fenola u grančici masline.

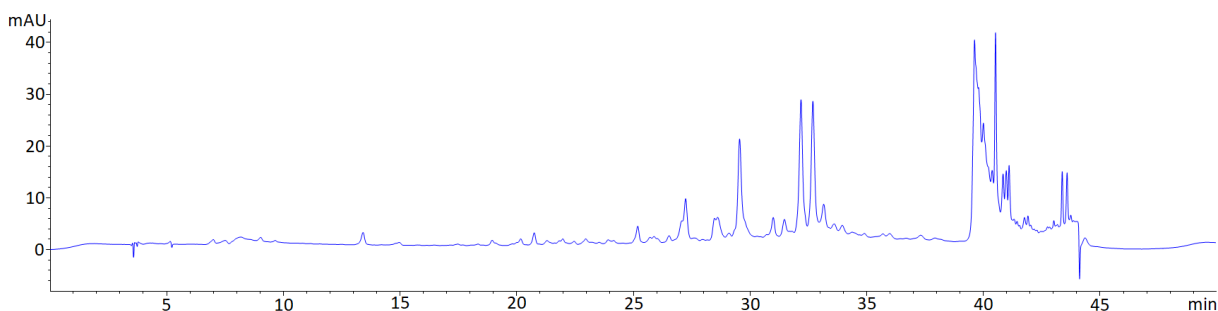
4.3. HPLC ANALIZA

4.3.1. Sadržaj oleuropeina u listu i grančici masline

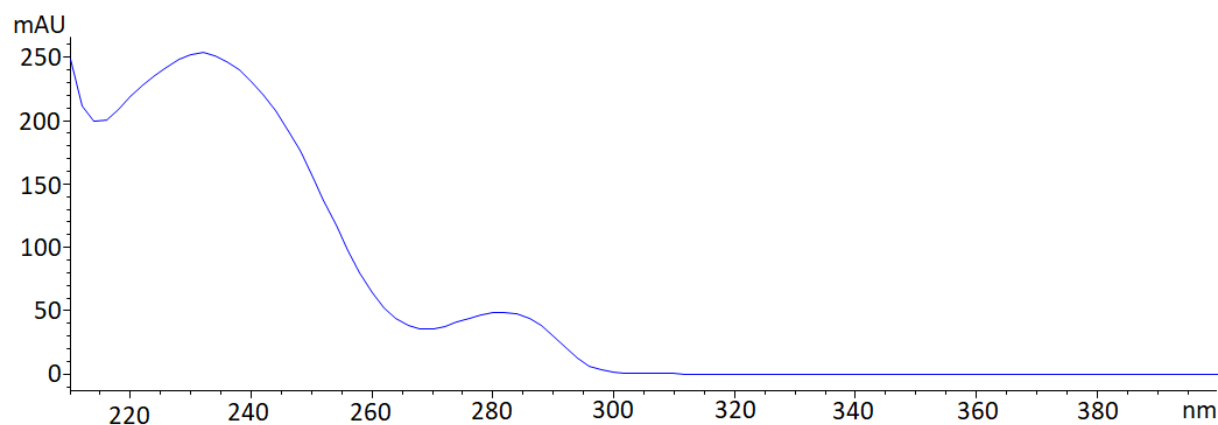
Provedena je analiza svih šest uzoraka na način da je svaka analiza rađena dva puta. Identifikacija oleuropeina u uzorcima napravljena je usporedbom retencijskih vremena i UV spektra s oleuropein standardom. Rezultati su prikazani u Tablicama 5 i 6.



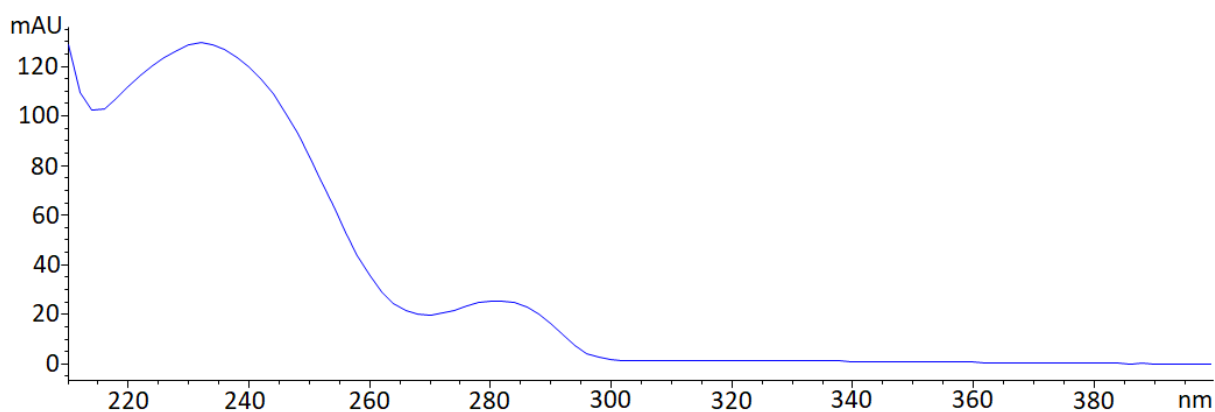
Slika 11. HPLC-DAD kromatogram standardne otopine oleuropeina; snimljeno na 280 nm.



Slika 12. HPLC-DAD kromatogram ekstrakta lista masline pripremljenog iz lišća pohranjenog na 4 °C; snimljeno na 280 nm.



Slika 13. ApSORPCIJSKI SPECTAR standardne otopine oleuropeina.



Slika 14. Apsorpcijski spektar ekstrakta grančice bez lista masline pripremljenog iz uzorka pohranjenog na 4 °C.

Tablica 5. HPLC analiza uzoraka lista i grančice masline.

UZORAK	m_e [mg]	t_r [min]	A [mAU*s]	γ [mg/mL]	$m(\text{OLE})$ [mg]
LE-ST	9,745	32,272	1195,5	0,08772	0,17545
	9,745	32,260	1198,4	0,08793	0,17586
GLE-ST	9,763	32,042	81,6	0,00814	0,01628
	9,763	32,042	82,8	0,00822	0,01645
GE-ST	4,761	32,028	131,1	0,01168	0,01168
	4,761	32,029	133,3	0,01183	0,01183
LE-4°C	11,836	32,206	1245,9	0,09132	0,36530
	11,836	32,183	1228,8	0,09010	0,36041
GLE-4°C	10,906	32,198	1066,7	0,07852	0,15704
	10,906	32,107	1005,7	0,07416	0,14832
GE-4°C	4,693	32,038	254,5	0,02049	0,02049
	4,693	32,037	260,3	0,02091	0,02091

m_e je masa ekstrakta uzetog za analizu i otopljenog u volumenu V metanola; t_r vrijeme zadržavanja; A površina ispod pika; γ koncentracija otopine ekstrakta; $m(\text{OLE})$ je masa oleuropeina u ekstraktu koji je uzet za analizu; LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4 °C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4 °C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4 °C

$$A = 13996,44 \text{ mL mg}^{-1} \gamma - 32,31$$

$$\gamma = \frac{A+32,31}{13996,44}, \quad m(\text{OLE}) = \gamma V$$

Tablica 6. HPLC analiza uzoraka lista i grančice masline.

UZORAK	$\frac{m(\text{OLE})}{m_e}$ [mg/g DE]	$\frac{\overline{m(\text{OLE})}}{m_e} \pm \text{SD}$ [mg/g DE]	RSD [%]	$\frac{\overline{m(\text{OLE})}}{m_e} \pm \text{SD}$ [mg/g DW]
LE-ST	18,00	18,02 ± 0,02	0,167	1,48 ± 0,00
	18,04			
GLE-ST	1,67	1,68 ± 0,01	0,741	0,11 ± 0,00
	1,68			
GE-ST	2,45	2,47 ± 0,02	0,946	0,09 ± 0,00
	2,49			
LE-4°C	30,86	30,66 ± 0,21	0,952	2,88 ± 0,03
	30,45			
GLE-4°C	14,40	14,00 ± 0,40	4,04	0,62 ± 0,02
	13,60			
GE-4°C	4,37	4,41 ± 0,04	1,42	0,16 ± 0,00
	4,45			

$\frac{m(\text{OLE})}{m_e}$ masa oleuropeina po masi ekstrakta; $\frac{\overline{m(\text{OLE})}}{m_e}$ srednja vrijednost; DE masa suhog ekstrakta; DW masa suhog biljnog uzorka; SD standardna devijacija; RSD relativna standardna devijacija; LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C

$$\frac{m(\text{OLE})}{m_e} [\text{mg/g DW}] = \frac{m_{se}}{m_u} \cdot \frac{m(\text{OLE})}{m_e} [\text{mg/g DE}]$$

Sadržaj OLE u analiziranim uzorcima bio je u rasponu od 1,68 do 30,66 mg/g DE te od 0,09 do 2,88 mg/g DW. Rezultati su pokazali da je sadržaj OLE bio značajno viši u LE u usporedbi sa GE, 18,02 mg/g DE naspram 2,47 mg/g DE za uzorke pohranjene na ST, te 30,66 mg/g DE naspram 4,41 mg/g DE za uzorke pohranjene na 4 °C. Za razliku od toga, Kishikawa i sur. (2015) u svojoj su studiji pokazali 3,4 puta veći sadržaj OLE u GE u odnosu na LE dobivenih od uzoraka sakupljenih u svibnju kao i 1,4 puta veći sadržaj OLE u GE u odnosu na LE za uzorke sakupljene u listopadu. Ova razlika može biti posljedica korištenja uzoraka od različitih sorti maslina u usporedbi s našim sortama, drugačijeg postupka sušenja i

ekstrakcije te činjenice da je ekstrakcija provedena odmah nakon sušenja bez dugotrajnog skladištenja uzoraka, no točne je uzroke potrebno razjasniti u budućim studijama. Ipak, u spomenutoj je studiji prikazano i da je sadržaj OLE prikazan kao mg/g DW bio 1,6 puta veći u listovima nego u grančicama skupljenima u listopadu zbog većeg iskorištenja ekstrakcije iz listova, dok je za uzorke skupljene u svibnju sadržaj OLE u mg/g DW bio 2,2 puta veći u grančicama nego u listovima. Naši rezultati pokazuju da je sadržaj OLE prikazan kao mg/g DW 16 do 18 puta veći u listovima u odnosu na grančice bez listova. Druga studija (Japón-Luján i De Castro, 2007) prikazuje koncentraciju OLE u mg/kg DW u grančicama i u listu masline pokazujući kako je sadržaj OLE oko 1,3 puta veći u listovima.

Općenito postoji jako malo radova koji govore o sadržaju OLE u grančicama masline. Već spomenuti Kishikawa i sur. (2015) izvješćuju o sadržaju OLE u grančicama od 6,0 i 13,5 mg/g DW, Japón-Luján i De Castro (2007) o 1,6 – 18,9 mg/g DW te Ortega-García i Peragón (2010) o 22,3 do 58,0 mg/g DW. Sve su to vrijednosti puno veće od naših koje iznose samo 0,09 mg/g DW za uzorke skladištene na ST i 0,16 mg/g DW za uzorke skladištene na 4 °C.

Sadržaj OLE u GLE bio je 1,68 mg/g DE i 0,11 mg/g DW za uzorke pohranjene na ST te značajno viši za uzorke pohranjene na 4 °C, točnije 14,00 mg/g DE i 0,62 mg/g DW. Uzrok tome, osim različite temperature skladištenja, mogao bi biti i različit omjer grančica u odnosu na lišće u uspoređivanim uzorcima.

Suprotno grančicama, o sadržaju OLE u listovima masline postoji znatno veći broj znanstvenih radova. Clodoveo i sur. (2021) u svom preglednom radu izvještavaju o širokom rasponu vrijednosti koncentracija od 0,073 do 210,65 mg/g DW, a razlog tome su brojni čimbenici koji utječu na sadržaj fenola u listu masline kao što je opisano u poglavlju 1.2.1. Naši rezultati za OLE u listu masline od 1,48 mg/g DW (ST) i 2,88 mg/g DW (4 °C) nalaze se unutar raspona navedenog u literaturi, ali bliže nižim vrijednostima.

Prijašnje istraživanje od Polić Pasković i sur. (2023), s nešto drugačijim postupkom sušenja i ekstrakcije, izvijestilo je o sadržaju OLE u listovima Istarske bjelice skupljenima tijekom rezidbe u ožujku od 40,7 mg/g DW, a u listovima Rosinjole od 50,6 mg/g DW, dok su za listove skupljene tijekom berbe u listopadu brojke bile puno manje, 13,9 i 5,00 mg/g DW, no i dalje znatno veće od naših vrijednosti. Giacometti i sur. (2021) odredili su da je sadržaj OLE u listovima Rosinjole skupljenima u svibnju 6,46 mg/g DW, a Cör Andrejč i sur. (2022) odredili su sadržaj OLE u Istarskoj bjelici od 2,23 do 6,83 mg/g DW, što su vrijednosti puno bliže našem rezultatu. Medfai i sur. (2020) određivali su fenolni sastav listova masline, prikupljenih u listopadu iz devet kultivara, korištenjem konvencionalne maceracije i ultrazvučne ekstrakcije. Kod ultrazvučne ekstrakcije dobivene vrijednosti OLE bile su 4,95

mg/g DW te 20,29 mg/g DE što je vrlo blizu našem rezultatu od 18,02 mg/g DE za listove skladištene na ST.

4.4. Utjecaj temperature skladištenja na fenolni sastav lista i grančice masline

Sadržaj OLE u LE i GE izražen preko DE i preko DW bio je otprilike dva puta veći za uzorke koji su skladišteni na 4 °C, u odnosu na uzorke skladištene na ST. Sadržaj OLE u GLE izražen preko DE bio je osam puta veći za uzorke koji su skladišteni na 4 °C, u odnosu na ST te izražen preko DW šest puta veći za uzorke koji su skladišteni na 4 °C, u odnosu na ST. To ukazuje na veću stabilnost OLE u biljnom materijalu skladištenom na nižoj temperaturi. Do sličnog su zaključka došli i Markhali i Teixeira (2024) koji su pokazali puno veći gubitak sadržaja OLE na 25 °C u odnosu na 4 °C i -20 °C, no oni su tijekom 8 tjedana pratili skladištenje ekstrakata lista, a ne suhog biljnog materijala. Martínez-Navarro i sur. (2021) u svojoj su studiji lišće samljeveno u prah skladištili na dvije temperature, sobnoj (oko 22 °C) i 40 °C te zaključili da temperatura ima utjecaj na stabilnost sadržaja OLE. Nasuprot tome, Feng i sur. (2021) lišće osušeno i samljeveno u prah skladištili su na -20 °C, 4 °C i 25 °C tijekom devet tjedana i zaključili kako je sadržaj OLE bio podjednak na svim trima temperaturama skladištenja. Ahmad-Qasem i sur. (2016) ekstrakte listova masline pohranili su na 4, 25 i 35 °C tijekom četiri tjedna i izvijestili kako temperatura skladištenja nije značajno utjecala na sadržaj OLE.

Za uzorke skladištene na 4 °C, vrijednosti TPC, *o*-DPC i TFC u LE izražene i preko DE i preko DW pokazuju veće vrijednosti u odnosu na uzroke skladištene na ST. S druge strane vrijednosti *o*-DPC u GLE i GE su veće u uzorcima skladištenima na ST nego u onima na 4 °C. Poznavajući razgradnju OLE (opisanu u poglavlju 1.2.2.) i uzimajući u obzir spomenutu dvostruku razliku u sadržaju OLE koja ukazuje na promjenu fenolnog sastava, ove bi rastuće vrijednosti *o*-DPC mogli objasniti time da razgradnjom sekoiridoida nastaju jednostavniji fenoli koji i dalje daju pozitivnu reakciju u testu na *o*-DPC. Vrijednosti TPC i TFC u GE izražene preko DW podjednake su na obje temperature skladištenja. Vrijednosti TPC i TFC u GLE izražene preko DW nešto su veće u uzorcima skladištenima na ST nego u onima na 4 °C. Mogući je razlog i drugačiji omjer grančica i listova u uzorku na ST i onom na 4 °C.

5. ZAKLJUČCI

- Ultrazvučnom ekstrakcijom pomoću etanola ekstrahirani su fenolni spojevi iz suhих samljevenih uzoraka lista, grančice s listom i grančice bez lista masline. Iskorištenje ekstrakcije pokazalo se najboljim kod lista masline.
- Uspoređujući suhe ekstrakte, pokazalo se da je sadržaj ukupnih fenola, *o*-difenola i ukupnih flavonoida, određenih UV-Vis metodom, bio najveći u ekstraktu grančice bez lista, a uspoređujući suhi biljni materijal, sadržaj ukupnih fenola, *o*-difenola i ukupnih flavonoida, bio je najveći u listu masline.
- Sadržaj oleuropeina određen je HPLC metodom te je pokazano kako je on znatno veći u ekstraktu lista masline u odnosu na ekstrakte grančica s i bez lišća. Uspoređujući suhi biljni materijal, sadržaj oleuropeina također je najveći u listu masline.
- Sadržaj oleuropeina bio je skoro duplo veći za uzorke koji su skladišteni na 4 °C, u odnosu na uzorke skladištene na sobnoj temperaturi. Najveći sadržaj oleuropeina, 30,7 mg/g suhog ekstrakta, određen je u ekstraktu lista pripremljenom iz lišća skladištenog na 4 °C.
- Temperatura skladištenja ima utjecaj na sadržaj ukupnih fenola, *o*-difenola, flavonoida i oleuropeina u biljnome materijalu koji je skladišten u vremenskom periodu od 3 mjeseca. Sobna temperatura pogoduje nešto bržoj razgradnji navedenih tvari u odnosu na 4 °C što je najbolje vidljivo iz duplog smanjenja sadržaja oleuropeina u uzorcima lista i grančice masline.
- Raspadom sekoiridoide, kao što je oleuropein, nastaju jednostavni fenoli, poput hidroksitirozola, što povećava sadržaj *o*-difenola u uzorku, a to je pokazano u rezultatima mjerenja sadržaja *o*-difenola u grančicama masline s listom i bez lista gdje su vrijednosti *o*-difenola veće u uzorcima skladištenima na sobnoj temperaturi nego u onima na 4 °C.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

CE	ekvivalent katehina (eng. catechin equivalent)
DE	masa suhog ekstrakta (eng. dry extract weight)
DW	masa suhog biljnog uzorka (eng. dry plant material weight)
F-C	Folin-Ciocalteu
GAE	ekvivalent galne kiseline (eng. gallic acid equivalent)
GE-4°C	ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4 °C
GE-ST	ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi
GLE-4°C	ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4 °C
GLE-ST	ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi
HPLC	tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. High Performance Liquid Chromatography)
LE-4°C	ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4 °C
LE-ST	ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi
<i>o</i> -DPC	sadržaj <i>o</i> -difenola (eng. <i>o</i> -diphenols content)
OLE	oleuropein
QE	ekvivalent kvercetina (eng. quercetin equivalent)
RSD	relativna standardna devijacija
SD	standardna devijacija
TFC	ukupni sadržaj flavonoida (eng. total flavonoids content)
TPC	ukupni sadržaj fenola (eng. total phenols content)

7. LITERATURA

Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive Tree (*Olea europaeae* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 2015, 4(4), 682-698.

Abdeljelil ZB, Tekaya M, Elmsellem H, Mechri B, Hammami M. Impact of season and foliar fertilisers on phenolics of leaves of Chemlali olive cultivar. *Moroccan J. Chem.*, 2017, 5(1).

Acar-Tek N, Ağagündüz D. Olive Leaf (*Olea europaea* L. folium): Potential Effects on Glycemia and Lipidemia. *Ann. Nutr. Metab.*, 2020, 76(1), 10–15.

Ahmad-Qasem MH, Ahmad-Qasem BH, Barrajon-Catalán E, Micol V, Cárcel JA, García-Pérez JV. Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. *Ind. Crops Prod.*, 2016, 79, 232–239.

Amidžić M, Marić P, Fumić B, Petlevski R, Bljajić K, Končić MZ. Oleuropein-Rich olive leaf extracts may ameliorate consequences of Glucose-Induced oxidative stress in HEP G2 cells. *Nat. Prod. Commun.*, 2018, 13(6), 1934578X1801300.

Autohtone sorte - Sorte maslina Istra, <https://www.istra.hr>, pristupljeno 1.4.2024.

Avraamides M, Fatta D. Resource consumption and emissions from olive oil production: a life cycle inventory case study in Cyprus. *J. Cleaner Prod.*, 2008, 16(7), 809–821.

Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C. Effects of the Olive-Derived polyphenol oleuropein on human health. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15(10), 18508–18524.

Brahmi F, Mechri B, Dabbou S, Dhibi M, Hammami M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind. Crops Prod.*, 2012, 38, 146–152.

Clewell AE, Béres E, Vértesi A, Glávits R, Hirka G, Endres JR, Murbach TS, Szakonyiné IP. A Comprehensive Toxicological Safety Assessment of an Extract of *Olea Europaea* L. Leaves (Bonolive™). *Int J Toxicol*. 2016, 35(2), 208-221.

Clodoveo ML, Crupi P, Annunziato A, Corbo F. Innovative Extraction Technologies for Development of Functional Ingredients Based on Polyphenols from Olive Leaves. *Foods*, 2021 11(1), 103.

Cör Andrejč D, Butinar B, Knez Ž, Tomažič K, Knez Marevci M. The effect of drying methods and extraction techniques on oleuropein content in olive leaves. *Plants*, 2022, 11(7), 865-882.

Dauber C, Parente E, Zucca M, Gámbaro A, Vieitez I. *Olea europaea* and By-Products: Extraction Methods and Cosmetic Applications. *Cosmetics*, 2023, 10(4), 112.

De Bock M, Derraik JGB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Hofman PL, Cutfield WS. Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PloS One*, 2013, 8(3), e57622.

De Cicco P, Ercolano G, Tenore GC, Ianaro A. Olive leaf extract inhibits metastatic melanoma spread through suppression of epithelial to mesenchymal transition. *Phytother Res*, 2022, 36(10), 4002-4013.

De Leonardis A, Macciola V, Cuomo F, Lopez F. Evidence of oleuropein degradation by olive leaf protein extract. *Food Chem*. 2015, 175, 568–574.

Espeso J, Isaza A, Lee JY, Sörensen PM, Jurado P, De Jesús Avena-Bustillos R, Olaizola M, Arboleya JC. Olive Leaf Waste Management. *Front Sustain Food Syst*, 2021, 5, 660582.

European Pharmacopoeia 8th edition Volume 1, Strasbourg, Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM), 2013, str. 1335-1337.

Fayez N, Khalil W, Abdel-Sattar E, Abdel-Fattah AM. In vitro and in vivo assessment of the anti-inflammatory activity of olive leaf extract in rats. *Inflammopharmacology.*, 2023, 31(3):1529-1538.

Feng S, Zhang C, Liu L, Xu Z, Chen T, Zhou L, Yuan M, Li T, Ding C. Comparison of phenolic compounds in olive leaves by different drying and storage methods. *Separations*, 2021, 8(9), 156.

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

Giacometti J, Milovanović S, Jurčić Momčilović D, Bubonja-Šonje M. Evaluation of antioxidant activity of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction and their antimicrobial activity against bacterial pathogens from food. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2021, 56(10), 4843–4850.

Goenka S, Simon SR. A Novel Pro-Melanogenic Effect of Standardized Dry Olive Leaf Extract on Primary Human Melanocytes from Lightly Pigmented and Moderately Pigmented Skin. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(3), 252.

Guex CG, Reginato FZ, Figueredo KC, da Silva ARHD, Pires FB, Jesus RDS, Lhamas CL, Lopes GHH, Bauermann LF. Safety assessment of ethanolic extract of *Olea europaea* L. leaves after acute and subacute administration to Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 2018, 95, 395-399.

Guinda Á, Castellano JM, Santos-Lozano JM, Delgado-Hervás T, Gutiérrez-Adánez P, Rada M. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *LWT--Food Sci Technol*, 2015, 64(1), 431–438.

Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1981, 58(11), 966–968.

Gutiérrez-Miranda B, Gallardo I, Melliou E, Cabero I, Álvarez Y, Hernández M, Magiatis P, Hernández M, Nieto ML. Treatment with the Olive Secoiridoid Oleacein Protects against the Intestinal Alterations Associated with EAE. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(5), 4977.

Harris DC. Quantitative chemical analysis. New York, W. H. Freeman and Company, 2010, str. 396., 397., 596. i 599.

HPLC Help Center by IDEX Health & Science, 2024., <https://www.idex-hs.com>, pristupljeno 15.5.2024.

Ibrahim EH, Abdelgaleel MA, Salama AA, Metwalli SM. Chemical and nutritional evaluation of olive leaves and selection the optimum conditions for extraction their phenolic compounds. *J. Agric. Res.*, 2016, 42(1), 445–459.

Japón-Luján R, De Castro MDL. Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55(11), 4584–4588.

Johnson RL, Mitchell AE. Reducing phenolics related to bitterness in table olives. *J. Food Qual.*, 2018, 1–12.

Jurišić Grubešić R, Nazlić M, Miletić T, Vuko E, Vuletić N, Ljubenković I, Dunkić V. Antioxidant Capacity of Free Volatile Compounds from *Olea europaea* L. cv. Oblica Leaves Depending on the Vegetation Stage. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(11), 1832.

Kantoci D. Olea prima omnium arborum est. Columella. *Glasnik Zaštite Bilja*, 2006, 29(6), 4-14.

Kealey D, Haines PJ. Analytical chemistry. Oxford, BIOS Scientific Publishers, 2002, str. 163.

Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 2003, 81(3), 321–326.

Kishikawa A, Ashour A, Zhu Q, Yasuda M, Ishikawa H, Shimizu K. Multiple Biological Effects of Olive Oil By-products such as Leaves, Stems, Flowers, Olive Milled Waste, Fruit Pulp, and Seeds of the Olive Plant on Skin. *Phytother. Res.*, 2015, 29(6), 877–886.

Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol.*, 2010, 101(10), 3751-4.

Lo Giudice V, Faraone I, Bruno MR, Ponticelli M, Labanca F, Bisaccia D, Massarelli C, Milella L, Todaro L. Olive trees By-Products as sources of bioactive and other industrially useful compounds: A Systematic review. *Mol. Online*, 2021, 26(16), 5081.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 218-220.

Markhali FS, Teixeira JA, Rocha CMR. Olive tree Leaves—A source of valuable active compounds. *Processes*, 2020, 8(9), 1177.

Markhali FS, Teixeira JA. Effect of storage, temperature, and pH on the preservation of the oleuropein content of olive leaf extracts. *Sustainable Food Technol.*, 2024

Martínez-Navarro ME, Cebrián-Tarancón C, Oliva J, Salinas MR, Alonso GL. Oleuropein degradation kinetics in olive leaf and its aqueous extracts. *Antioxidants*, 2021, 10(12), 1963.

Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F, Cert A. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49(5), 2185–2192.

Medfai W, Del Mar Contreras M, Lama-Muñoz A, Mhamdi R, Oueslati I, Castro E. How cultivar and extraction conditions affect antioxidants type and extractability for olive leaves valorization. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2020, 8(13), 5107–5118.

Moudache M, Silva F, Nerín C, Zaidi F. Olive cake and leaf extracts as valuable sources of antioxidant and antimicrobial compounds: a comparative study. *Waste Biomass Valorization*, 2020, 12(3), 1431–1445.

M'Rabet Y, Hosni K, Khwaldia K. Effects of oleuropein-rich olive leaf extract on the oxidative stability of refined sunflower oil. *Grasas Aceites*, 2023, 74(2), e505.

Nicolì F, Negro C, Vergine M, Aprile A, Nutricati E, Sabella E, Miceli A, Luvisi A, De Bellis L. Evaluation of Phytochemical and Antioxidant Properties of 15 Italian *Olea europaea* L. Cultivar Leaves. *Molecules*, 2019, 24(10), 1998.

Novoselić A, Tosci TG, Klisović D, Tura M, Bubola KB. Compositional Changes during Storage of Industrially Produced Olive Oils Co-Milled with Olive Leaves. *Foods*, 2023, 13(1), 73.

Olive Oil Production by Country, 2024., <https://worldpopulationreview.com>, pristupljeno 20.7.2024.

Oliveira AS, Gondim S, Gómez-García R, Ribeiro T, Pintado M. Olive leaf phenolic extract from two Portuguese cultivars –bioactivities for potential food and cosmetic application. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2021, 9(5), 106175.

Omer SA, Elobeid M, Elamin MH, Hassan ZK, Virk P, Daghestani M, Al-Olayan E, Al-Eisa NA, Almarhoon Z. Toxicity of olive leaves (*Olea europaea* L.) in Wistar albino rats. *Asian J Anim Vet Adv.*, 2012, 7(11), 1175–82.

Ortega-García F, Peragón J. HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, 90(13), 2295–2300.

Pasković I, Lukić I, Žurga P, Majetić Germek V, Brkljača M, Koprivnjak O, Major N, Grozić K, Franić M, Ban D, Marcelić Š, Goreta Ban S. (2020). Temporal variation of phenolic and mineral composition in olive leaves is cultivar dependent. *Plants*, 2020, 9(9), 1099.

Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy. Belmont, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009, str. 387-390.

Pennisi R, Ben Amor I, Gargouri B, Attia H, Zaabi R, Chira AB, Saoudi M, Piperno A, Trischitta P, Tamburello MP, Sciortino MT. Analysis of Antioxidant and Antiviral Effects of Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extracts and Pure Compound Using Cancer Cell Model. *Biomolecules*, 2023, 13(2), 238.

Polić Pasković M, Vidović N, Lukić I, Žurga P, Majetić Germek V, Goreta Ban S, Kos T, Čoga L, Tomljanović T, Simonić-Kocijan S, Ban D, Godena S, Pasković I. Phenolic Potential of Olive Leaves from Different Istrian Cultivars in Croatia. *Horticulturae*, 2023, 9(5), 594.

Putnik P, Barba FJ, Španić I, Zorić Z, Dragović-Uzelac V, Kovačević DB. Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food Bioprod. Process.*, 2017, 106, 19–28.

Ramírez EM, Brenes M, Romero C, Medina E. Chemical and Enzymatic Characterization of Leaves from Spanish Table Olive Cultivars. *Foods*, 2022, 11(23), 3879.

Rishmawi S, Haddad F, Dokmak G, Karaman R. A Comprehensive review on the Anti-Cancer effects of Oleuropein. *Life*, 2022, 12(8), 1140-1158.

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(8), 1776.

Rufino-Palomares EE, Pérez-Jiménez A, García-Salguero L, Mokhtari K, Reyes-Zurita FJ, Peragón-Sánchez J, Lupiáñez JA. Nutraceutical Role of Polyphenols and Triterpenes Present in the Extracts of Fruits and Leaves of *Olea europaea* as Antioxidants, Anti-Infectives and Anticancer Agents on Healthy Growth. *Molecules*, 2022, 27(7), 2341.

Selim S, Albqmi M, Al-Sanea MM, Alnusaire TS, Almuhayawi MS, Abdelgawad H, Jaouni SKA, Elkelish A, Hussein S, Warrad M, El-Saadony MT. Valorizing the usage of olive

leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Front Nutr*, 2022, 9, 1008349.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of instrumental analysis. Boston, Cengage Learning, 2017, str. 753-757.

Sorte maslina, 2024., <https://izbormaslina.com>, pristupljeno 20.7.2024.

Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV, Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J Antimicrob Agents.*, 2009, 33(5), 461-3.

UV-Vis Spectrophotometers, 2024., <https://www.implen.de>, pristupljeno 1.6.2024.

UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications, 2021., <https://www.technologynetworks.com>, pristupljeno 1.4.2024.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. Sažetak

Nakon rezidbe stabala masline nastaje mnogo otpada u obliku lišća i grančica koji su bogati polifenolima. U sklopu ovog diplomskog rada izrađeni su suhi ekstrakti lista masline, grančice s listom te grančice bez lista. Biljni materijal sušen je na zraku i zatim čuvan na sobnoj temperaturi i na 4°C tri mjeseca prije ekstrakcije. Nakon ekstrakcije pomoću ultrazvučne kupelji i pripreme suhih ekstrakata, analiziran je sadržaj ukupnih polifenola (TPC), *o*-difenola (*o*-DPC) i ukupnih flavonoida (TFC) UV-Vis metodom te oleuropeina (OLE) HPLC metodom. Uspoređen je sadržaj navedenih tvari u osušenim uzorcima čuvanim na sobnoj temperaturi i onima na 4°C. Ekstrakt lista pripremljen iz lišća skladištenog na 4°C imao je najveći sadržaj OLE, 30,7 mg/g suhog ekstrakta (DE), a i rezultati izraženi po masi suhog biljnog uzorka (DW) pokazali su najveći sadržaj OLE u listu skladištenom na 4°C, 2,88 mg/g DW. Sadržaj TPC i TFC bio je najveći u ekstraktu grančica bez lišća skladištenima na 4°C s vrijednostima od 193 mg GAE/g DE, odnosno 82,9 mg CE/g DE). Rezultati izraženi po DW, pokazali su najveći sadržaj u listu skladištenom na 4°C s vrijednostima TPC od 14,1 mg GAE/g DW te TFC od 5,99 mg CE/g DW. Sadržaj *o*-DPC bio je najveći u ekstraktu lista na 4°C, 150 mg GAE/g DE, te u listu na 4°C, 14,1 mg GAE/g DE. Ovaj je rad pokazao da temperatura skladištenja biljnoga materijala ima utjecaj na vrijednosti TPC, *o*-DPC, TFC i posebice OLE, čiji je sadržaj bio skoro dvostruko niži u uzorcima skladištenima na sobnoj temperaturi.

8.2. Summary

After pruning olive trees, a significant amount of waste is generated in the form of leaves and branches, which are rich in polyphenols. As part of this thesis, dry extracts were prepared from olive leaves, branches with leaves, and branches without leaves. The plant material was air-dried and then stored at room temperature and at 4°C for three months before extraction. After extraction using an ultrasonic bath and preparation of dry extracts, the total polyphenol content (TPC), *o*-diphenol content (*o*-DPC), and total flavonoid content (TFC) were analyzed using the UV-Vis method, while oleuropein (OLE) was analyzed using the HPLC method. The content of these compounds in the dried samples stored at room temperature and ones at 4°C was then compared. The leaf extract prepared from leaves stored at 4°C had the highest OLE content, 30.7 mg/g of dry extract (DE), and the results expressed per dry plant material (DW) showed the highest OLE content in leaves stored at 4°C, 2.88 mg/g DW. The TPC and TFC content was highest in the extract from branches without leaves stored at 4°C, with values of 193 mg GAE/g DE and 82.9 mg CE/g DE, respectively. Results expressed per DW showed the highest content in leaves stored at 4°C, with TPC values of 14.1 mg GAE/g DW and TFC of 5.99 mg CE/g DW. The *o*-DPC content was highest in the leaf extract stored at 4°C, 150 mg GAE/g DE, and in leaves at 4°C, 14.1 mg GAE/g DW. This study showed that the storage temperature of plant material affects the values of TPC, *o*-DPC, TFC, and especially OLE, whose content was nearly half as low in samples stored at room temperature.

9. PRILOZI

9.1. HPLC analiza - prikladnost sustava i validacija metode

Kako bi se potvrdila prikladnost sustava, parametri prikladnosti sustava izmjereni su ubrizgavanjem standardne otopine oleuropeina (40 µg/mL) u šest ponavljanja. Procijenjeni su parametri prikazani u Tablici 7. Faktor zadržavanja i broj tavana izračunati su prema US farmakopeji (USP).

Tablica 7. Prikladnost sustava ($n = 6$).

γ [mg/mL]	t_r [min]	A [mAU*s]	A_s	pp	$w_{1/2}$ [min]	N	t_0 [min]	k
0,04	32,272	506,0	0,965	999	0,1483	757686,313	3,54	8,116
0,04	32,448	453,6	0,978	999,2	0,1334	946638,558	3,54	8,166
0,04	32,237	514,9	0,975	999,7	0,1279	1016454,943	3,54	8,106
0,04	32,316	523,7	0,973	999,7	0,1337	934743,313	3,54	8,129
0,04	32,367	532,2	0,998	999,9	0,1321	960548,378	3,54	8,143
0,04	32,357	543,3	1,066	999,9	0,1327	951293,731	3,54	8,140
\bar{x}	32,333	512,283	0,993	999,567	0,135	927894,206	3,540	8,134
SD	0,069	28,807	0,034	0,345	0,006	80442,344	0,000	0,019
RSD [%]	0,21	5,62	3,46	0,03	4,74	8,67	0,00	0,24

γ je koncentracija standardne otopine oleuropeina, t_r vrijeme zadržavanja, A površina ispod pika, A_s faktor simetrije, pp čistoća pika, $w_{1/2}$ širina pika na polovici maksimalne visine, N broj tavana, t_0 mrtvo vrijeme, k faktor zadržavanja

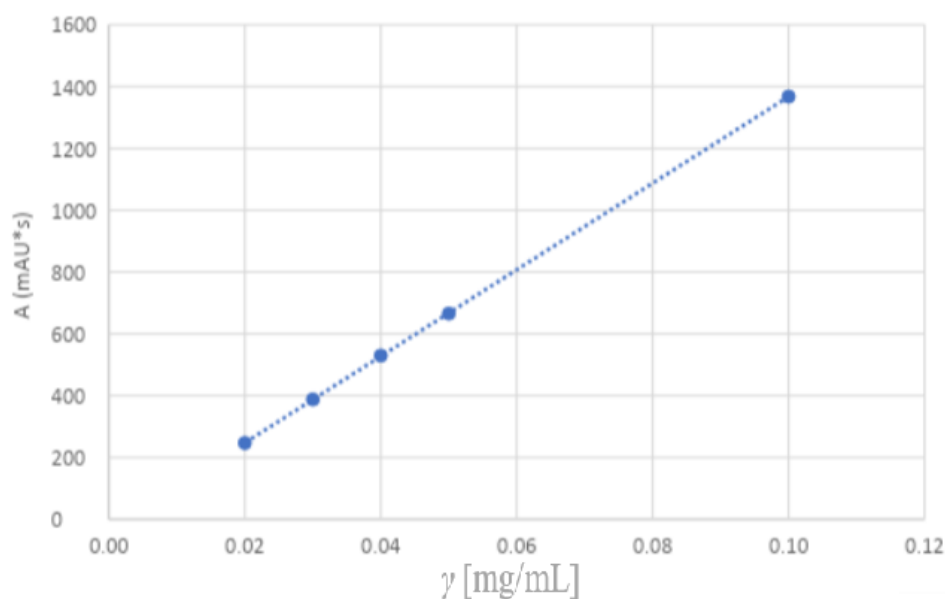
$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Validacija metode provedena je prema ICH smjernicama.

Kalibracijska krivulja izrađena je pomoću pet razina koncentracija u rasponu od 20 do 100 µg/mL kako bi se procijenila linearnost metode. Rezultati linearnosti prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Linearnost metode.

γ [mg/mL]	t_r [min]	A [mAU*s]
0,10	32,073	1367,5
0,05	32,129	665,5
0,04	32,167	529,8
0,03	32,217	387,8
0,02	32,310	247,0



Slika 15. Graf ovisnosti površine ispod kromatografskog pika o koncentraciji analita u uzorku.

jednadžba pravca $A = 13996.44 \text{ mL mg}^{-1} \gamma - 32.31$

koeficijent regresije $r = 0,999994$

Utvrđeno je da je kalibracijska krivulja linearna s dobrom vrijednošću koeficijenta regresije ($r > 0,999$).

Unutardnevna preciznost izvedena je ubrizgavanjem standardne otopine (40 $\mu\text{g/mL}$) u šest ponavljanja. Preciziranje između dana provedeno je na istim razinama koncentracije dva uzastopna dana u tri ponavljanja. Podaci izraženi kao relativna standardna devijacija površine vrha prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Preciznost metode.

1. dan ($n = 6$)			2. dan ($n = 3$)		
γ [mg/mL]	t_r [min]	A [mAU*s]	γ [mg/mL]	t_r [min]	A [mAU*s]
0,04	32,448	506	0,04	32,167	530,7
0,04	32,237	514,9	0,04	32,267	508,2
0,04	32,316	523,7	0,04	32,298	534
0,04	32,32	502,6			
0,04	32,237	532,2			
0,04	32,448	543,4			
\bar{x}	32,334	520,467	\bar{x}	32,244	524,300
SD	0,087	14,338	SD	0,056	11,464
RSD [%]	0,27	2,75	RSD [%]	0,17	2,19

oba dana ($n = 9$)		
	t_r [min]	A [mAU*s]
\bar{x}	32,304	521,744
SD	0,089	13,570
RSD [%]	0,27	2,60

Točnost metode procijenjena je testovima oporavka na tri razine koncentracije u tri ponavljanja.

Tablica 10. Točnost metode.

γ [mg/mL]	t_r [min]	A [mAU*s]	γ_{exp} [mg/mL]	rec [%]	\bar{x} [%]	SD	RSD [%]
0,1	32,367	1351	0,0988	98,84	98,810	0,849	0,86
0,1	32,357	1335,9	0,0978	97,76			
0,1	32,355	1365	0,0998	99,84			
0,04	32,448	506	0,0385	96,15	97,738	1,291	1,32
0,04	32,237	514,9	0,0391	97,74			
0,04	32,316	523,7	0,0397	99,32			
0,02	32,342	247,4	0,0200	99,92	99,579	1,666	1,67
0,02	32,332	251,6	0,0203	101,43			
0,02	32,332	240,3	0,0195	97,39			

eksperimentalna koncentracija $\gamma_{exp} = \frac{A+32,31}{13996,44}$ oporavak $rec = \frac{\gamma_{exp}}{\gamma} \cdot 100$

Tablica 11. HPLC analiza uzoraka.

uzorak	t_r [min]	A_S	R_S	pp
LE-ST	32,272	0,928	1,560	989,6
	32,260	0,902	1,855	985,5
GLE-ST	32,042	1,12	0,600	983,2
	32,042	0,957	0,614	984,6
GE-ST	32,028	1,03	1,101	984,6
	32,029	1,061	1,307	984,2
LE-4°C	32,206	0,895	5,097	996,5
	32,183	1,06	5,796	990,4
GLE-4°C	32,198	0,968	1,477	992,4
	32,107	0,952	1,908	993,6
GE-4°C	32,038	1,095	2,908	989,6
	32,037	1,017	2,913	996,8

t_r je vrijeme zadržavanja; A_S faktor simetrije; R_S razlučivanje; pp čistoća pika; LE-ST – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GLE-ST – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; GE-ST – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na sobnoj temperaturi; LE-4°C – ekstrakt lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GLE-4°C – ekstrakt grančice s listom masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C; GE-4°C – ekstrakt grančice bez lista masline dobiven od uzoraka čuvanih na 4°C

$R_S = \frac{1.18(t_{r2}-t_{r1})}{w_2+w_1}$ gdje su t_{r2} i t_{r1} vremena zadržavanja susjednih pikova, w_2 i w_1 širine pikova na polovici maksimalne visine

Razlučivost pika oleuropeina od susjednih pikova u uzorcima bila je u rasponu od 0,600 do 5,796 s čistoćom pika višom od 983 i simetrijom unutar raspona od 0,895 – 1,12.

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTACION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za fizikalnu kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ TEMPERATURE SKLADIŠTENJA NA FENOLNI SASTAV LISTA I GRANČICE MASLINE

Mihaela Fadljević

SAŽETAK

Nakon rezidbe stabala masline nastaje mnogo otpada u obliku lišća i grančica koji su bogati polifenolima. U sklopu ovog diplomskog rada izrađeni su suhi ekstrakti lista masline, grančice s listom te grančice bez lista. Biljni materijal sušen je na zraku i zatim čuvan na sobnoj temperaturi i na 4°C tri mjeseca prije ekstrakcije. Nakon ekstrakcije pomoću ultrazvučne kupelji i pripreme suhih ekstrakata, analiziran je sadržaj ukupnih polifenola (TPC), *o*-difenola (*o*-DPC) i ukupnih flavonoida (TFC) UV-Vis metodom te oleuropeina (OLE) HPLC metodom. Uspoređen je sadržaj navedenih tvari u osušenim uzorcima čuvanim na sobnoj temperaturi i onima na 4°C. Ekstrakt lista pripremljen iz lišća skladištenog na 4°C imao je najveći sadržaj OLE, 30,7 mg/g suhog ekstrakta (DE), a i rezultati izraženi po masi suhog biljnog uzorka (DW) pokazali su najveći sadržaj OLE u listu skladištenom na 4°C, 2,88 mg/g DW. Sadržaj TPC i TFC bio je najveći u ekstraktu grančica bez lišća skladištenima na 4°C s vrijednostima od 193 mg GAE/g DE, odnosno 82,9 mg CE/g DE). Rezultati izraženi po DW, pokazali su najveći sadržaj u listu skladištenom na 4°C s vrijednostima TPC od 14,1 mg GAE/g DW te TFC od 5,99 mg CE/g DW. Sadržaj *o*-DPC bio je najveći u ekstraktu lista na 4°C, 150 mg GAE/g DE, te u listu na 4°C, 14,1 mg GAE/g DE. Ovaj je rad pokazao da temperatura skladištenja biljnoga materijala ima utjecaj na vrijednosti TPC, *o*-DPC, TFC i posebice OLE, čiji je sadržaj bio skoro dvostruko niži u uzorcima skladištenima na sobnoj temperaturi. Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 53 stranica, 15 grafičkih prikaza, 11 tablica i 68 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: maslina, list, grančica, oleuropein, fenoli, *o*-difenoli, flavonoidi, HPLC, UV-Vis

Mentor: **Dr. sc. Ana Karković Marković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Karković Marković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Monika Barbarić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Cvijeta Jakobić Brala, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of physical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE ON THE PHENOLIC COMPOSITION OF OLIVE LEAVES AND BRANCHES

Mihaela Fadljević

SUMMARY

After pruning olive trees, a significant amount of waste is generated in the form of leaves and branches, which are rich in polyphenols. As part of this thesis, dry extracts were prepared from olive leaves, branches with leaves, and branches without leaves. The plant material was air-dried and then stored at room temperature and at 4°C for three months before extraction. After extraction using an ultrasonic bath and preparation of dry extracts, the total polyphenol content (TPC), *o*-diphenol content (*o*-DPC), and total flavonoid content (TFC) were analyzed using the UV-Vis method, while oleuropein (OLE) was analyzed using the HPLC method. The content of these compounds in the dried samples stored at room temperature and ones at 4°C was then compared. The leaf extract prepared from leaves stored at 4°C had the highest OLE content, 30.7 mg/g of dry extract (DE), and the results expressed per dry plant material (DW) showed the highest OLE content in leaves stored at 4°C, 2.88 mg/g DW. The TPC and TFC content was highest in the extract from branches without leaves stored at 4°C, with values of 193 mg GAE/g DE and 82.9 mg CE/g DE, respectively. Results expressed per DW showed the highest content in leaves stored at 4°C, with TPC values of 14.1 mg GAE/g DW and TFC of 5.99 mg CE/g DW. The *o*-DPC content was highest in the leaf extract stored at 4°C, 150 mg GAE/g DE, and in leaves at 4°C, 14.1 mg GAE/g DW. This study showed that the storage temperature of plant material affects the values of TPC, *o*-DPC, TFC, and especially OLE, whose content was nearly half as low in samples stored at room temperature.

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

Thesis includes: 53 pages, 15 figures, 11 tables and 68 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive, leaf, branch, oleuropein, phenols, *o*-diphenols, flavonoids, HPLC, UV-Vis

Mentor: **Ana Karković Marković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Karković Marković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Monika Barbarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D. Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2024.