

Utjecaj temperature pripreme na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća autohtonih sorti

Previšić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:678547>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Iva Previšić

**UTJECAJ TEMPERATURE PRIPREME NA FENOLNI SASTAV I
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET INFUZIJA MASLINOVOG LIŠĆA
AUTOHTONIH SORTI**

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Iva Previšić

**UTJECAJ TEMPERATURE PRIPREME NA FENOLNI SASTAV I
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET INFUZIJA MASLINOVOG LIŠĆA
AUTOHTONIH SORTI**

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.

Diplomski rad obranjen je dana 24. rujna 2019. na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred

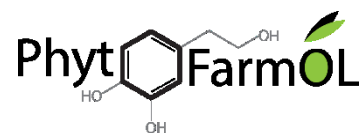
Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.
2. Doc. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.
3. Doc. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.

Rad ima 52 stranice, 11 slika, 10 tablica i 43 literaturna navoda.

Istraživanje je provedeno u sklopu uspostavno istraživačkog projekta „Bilinogojstvom do sekundarnih biljnih metabolita: primjena mineralnih hraniva i elicitora za povećanje koncentracije fenola u listu masline“ (UIP-2017-05-8464; *Phytofarmol*) financiranog od Hrvatske zaklade za znanost. Dio istraživanja u ovom radu proveden je u sklopu potpore Sveučilišta u Rijeci UNIRI-TEHNIK-18-294.

Rad je izrađen na Katedri za tehnologiju i kontrolu namirnica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i na Odsjeku za zajedničke analitičke tehnike Zdravstveno-ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.



ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Valeriji Germek Majetić, dipl. sanit. ing. na nesebičnom dijeljenju znanja, stalnoj dostupnosti, svim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada jer bez nje ovaj rad ne bi bio ono što je.

Veliko hvala mr.sc. Pauli Žurga, dipl. ing. biotehn. sa Odsjeka za zajedničke analitičke tehnike Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ što nam je omogućila provedbu analiza fenolnih tvari tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Hvala dr. sc. Igoru Paskoviću, dipl. ing. agr. voditelju projekta Phytofarmol na osiguranim uzorcima maslinovog lišća za ovo istraživanje i pruženoj prilici za rad i izradu diplomskog rada u sklopu spomenutog projekta.

Želim se zahvaliti prof. dr. sc. Oliveri Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh. te Bojani Lukić, mag. sanit. ing., na svim savjetima, novim informacijama, podršci, ali i primjedbama koje će mi pomoći u daljnjem radu, ali i životu. Hvala što ste mi omogućili da se s Vama u laboratoriju osjećam kao dio kolektiva.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i prijateljima na konstantnoj podršci!

Utjecaj temperature pripreme na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća autohtonih sorti

Sažetak

U radu je istražen fenolni sastav maslinovog lišća autohtonih sorti (Drobnice, Lastovke i Oblice) te njihovih vodenih infuzija pripremanih hladnim (25 °C/30 min.) i toplim postupkom (75 °C/3 min. i 100 °C/3 min.). Istražen je utjecaj načina pripreme infuzija na fizikalno-kemijske karakteristike (udio suhe tvari, pH vrijednost i električnu provodljivost) te na antioksidacijski kapacitet infuzija. Fenolni sastav maslinovog lišća i infuzija određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/VIS detektorom, a antioksidacijski kapacitet infuzija određen je mjerenjem gubitka DPPH radikala spektrofotometrijski. Lišće autohtonih sorti značajno se razlikovalo u sastavu fenola, osobito s obzirom na maseni udio luteolina, luteolin-7-*O*-glukozida, rutina i verbaskozida. Oleuropein i luteolin-7-*O*-glukozid bili su najzastupljeniji fenoli, a najviše masene udjele imalo je lišće Oblice 95,44 mg/g s.t. odnosno 7,11 mg/g s.t. Povećanje temperature pripreme s 25 °C na 100 °C nije utjecalo na udio suhe tvari infuzija, blago, ali statistički značajno je smanjilo pH vrijednost te povisilo električnu provodljivost samo infuzija Lastovke. Viša temperatura pripreme infuzija statistički je značajno povećala masene koncentracije većine fenolnih tvari, izuzev apigenina, fenolnih kiselina i vanilina. Također, priprema na 100 °C povisila je antioksidacijski kapacitet infuzija sve tri sorte u odnosu na pripremu pri 25 °C/30 min., što ukazuje na bolju topljivost fenola u vodenim otopinama pri višim temperaturama.

Ključne riječi: maslinovo lišće, infuzije, fenoli, antioksidacijski kapacitet, HPLC-UV/VIS

Influence of water temperature on phenol composition and antioxidative capacity of olive leaf infusions of autochthonous cultivars

Summary

The phenolic composition of olive leaves of autochthonous cultivars (Drobnica, Lastovka and Oblica) and water infusions prepared in cold (25 °C/30 min.) and hot processes (75 °C/3 min. and 100 °C/3 min) were investigated in the paper. The influence of the infusion preparation method on the physicochemical characteristics (dry matter content, pH value and electrical conductivity) and the antioxidant capacity of the infusion were also investigated. The phenolic composition of olive leaves and infusions was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a UV / VIS detector, and the antioxidant capacity of the infusion was determined by spectrophotometric measurement of DPPH free radical loss. The leaves of the autochthonous cultivars was different in phenol composition, especially considering the mass fraction of luteolin, luteolin-7-*O*-glucoside, rutin and verbascoside. Oleuropein and luteolin-7-*O*-glucoside were the most abundant phenols, and the leaves of Oblica cv. had the highest mass fractions 95.44 mg/g d.m. and 7.11 mg/g d.m respectively. The increase the preparation temperature from 25 °C to 100 °C did not affect the dry matter content of the infusion, slightly but statistically significantly decreased the pH value and increased the electrical conductivity only of the Lastovka infusions. The higher temperature of the infusion preparation statistically significantly increased the mass concentration of the most phenolic substances, except for apigenin, phenolic acids and vanillin. In addition, preparation at 100 °C increased the antioxidant capacity of the infusions of all three cultivars compared to preparation at 25 °C/30 min. what indicates that phenols in an aqueous solution have better solubility at higher temperatures.

Key words: olive leaves, infusions, phenols, antioxidant capacity, HPLC-UV/VIS

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA | 1 |
| 1.1. Maslina | 2 |
| 1.2. Sorte maslina | 2 |
| 1.3. Maslinovo lišće..... | 3 |
| 1.3.1. Fenolne tvari u maslinovom lišću | 4 |
| 1.3.2. Utjecaj abiotičkih i biotičkih čimbenika na sastav maslinovog lišća..... | 7 |
| 1.3.3. Metabolizam fenola..... | 7 |
| 1.3.4. Metode detekcije fenolnih spojeva..... | 8 |
| 1.4. Praćenje fizikalno-kemijskih parametara | 8 |
| 1.5. Antioksidacijska aktivnost i antioksidacijski kapacitet | 8 |
| 1.5.1. Antioksidacijska aktivnost vodenih infuzija i metanolnih ekstrakata maslinovog lišća..... | 9 |
| 1.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta | 10 |
| 1.6. Pozitivni zdravstveni učinci konzumacije infuzija od maslinovog lišća..... | 10 |
| 1.6.1. Antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća | 11 |
| 1.6.2. Drugi zdravstveni učinci | 11 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 13 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 14 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 14 |
| 3.1.1. Uzorci maslinovog lišća | 14 |
| 3.1.2. Kemikalije i standardi | 15 |
| 3.1.3. Uređaji i pribor | 16 |
| 3.2. METODE RADA | 17 |
| 3.2.1. Priprema maslinovog lišća za analize | 17 |
| 3.2.2. Ekstrakcija fenolnih tvari iz maslinovog lišća | 18 |
| 3.2.3. Priprema vodenih infuzija maslinovog lišća | 18 |
| 3.2.4. Priprema ekstrakta fenolnih tvari i vodenih infuzija za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti..... | 19 |
| 3.2.5. Određivanje suhe tvari infuzija standardnom metodom sušenja..... | 19 |
| 3.2.6. Određivanje električne provodljivosti i pH vrijednosti infuzija..... | 20 |
| 3.2.7. Određivanje sastava fenolnih tvari tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti | 20 |
| 3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta infuzija metodom DPPH | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.9. Statistička analiza rezultata | 23 |
| 4. REZULTATI..... | 25 |
| 4.1. Fenolni sastav lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica | 25 |
| 4.2. Utjecaj temperature pripreme na fizikalno-kemijska svojstva infuzija maslinovog lišća | 26 |
| 4.3. Utjecaj temperature pripreme na sastav fenola u infuzijama maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice | 27 |
| 4.4. Utjecaj temperature pripreme na antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice | 32 |
| 4.5. Korelacijski odnosi | 33 |
| 5. RASPRAVA..... | 34 |
| 5.1. Fenolni sastav maslinovog lišća | 34 |
| 5.2. Utjecaj temperature pripreme na fizikalno-kemijska svojstva infuzija maslinovog lišća | 36 |
| 5.3. Utjecaj temperature pripreme na sastav fenola u infuzijama maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice | 37 |
| 5.4. Utjecaj temperature pripreme na antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice | 40 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 41 |
| 7. LITERATURA..... | 42 |
| PRILOZI..... | 46 |
| Životopis..... | 49 |
| Popis tablica..... | 51 |
| Popis slika..... | 52 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Maslina (lat. *Olea europaea* L.) je jedna od najstarijih agrokultura koja i danas dominira Europom te čini 31 % ukupne svjetske proizvodnje (Shahbandeh, 2018). Vodeću ulogu u proizvodnji maslina imaju zemlje uz Mediterana, a prema dostupnim podacima „Worldatlasa“ u proizvodnji prednjače Španjolska i Italija (Sawe, 2017). Prema podacima iz travnja 2018. godine na sortnoj listi maslina Republike Hrvatske trenutno se nalazi 26 sorti, od kojih su najznačajnije Oblica, Buža, Istarska Bjelica, Drobница, Lastovka, Levantinka i druge (Maslinar, 2018).

U proizvodnji maslina gdje se primarno uzgaja sam plod, maslinovo lišće smatra se agronomskim i industrijskim otpadnim materijalom. Maslinovo lišće visoko je vrijedan otpadni biljni materijal, izvor različitih vrsta biofenola, od čega najviše dominiraju sekoiridoidi (oleuropein), flavonoidi, fenolne kiseline i alkoholi. Brojna istraživanja ukazuju na njihovu visoku antioksidacijsku aktivnost. Biofenoli imaju različite blagotvorne učinke na organizam, djeluju antimikrobno, antivirusno, a pomažu i kod brojnih infekcija (Souilem, et al., 2017). Iako je u povijesti imalo različitu uporabu, najčešći način korištenja bile su vodene infuzije. Vodene infuzije maslinovog lišća upotrebljavaju se kod kožnih oboljenja, za snižavanje krvnog tlaka, za liječenje kardiovaskularnih bolesti, a nekada su se koristile za liječenje malarije (Sahin & Bilgin, 2017).

Različitim postupcima ekstrakcije danas se pokušava izolirati što veća količina fenola, a istovremeno dobiti i što prikladniji proizvod za uporabu, a maslinovo lišće od posebnog je interesa zbog svog terapijskog učinka.

Cilj ovog rada je utvrditi kako temperatura pripreme utječe na fenolni sastav i antioksidacijsku aktivnost vodenih infuzija maslinovog lišća odabranih autohtonih sorti.

1.1. Maslina

Uzgoj maslina jedna je od značajnih kultura u Hrvatskoj te se većinom kultivira zbog proizvodnje maslinovog ulja. Nusproizvodi pri proizvodnji maslina i maslinovog ulja koriste se za dobivanje komposta (komina) i za dobivanje energije (fragmenti koštica), a lišće koje se dobiva prilikom orezivanja i prerade maslina, uglavnom ostaje neiskorišteno. Maslinovo lišće je jeftin izvor visokovrijednih biološki aktivnih spojeva te je njegova uporaba slabo iskorištena.

1.2. Sorte maslina

U Hrvatskoj se mogu naći autohtone sorte maslina koje se razlikuju po svojim karakteristikama. Neke od najvažnijih autohtonih sorti jesu Oblica, odnosno obična maslina, Buža, Lastovka, Istarska Bjelica i druge. Većina njih nalazi se na hrvatskoj sortnoj listi, dok su Drobnica, Lastovka i Oblica samo neke koje su uvrštene na popis svjetskih sorti maslina od strane Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje (eng. *International Olive Council*, COI) u Madridu. U Tablici 1. prikazane su glavne karakteristike sorti od interesa koje se najviše razlikuju po dužini, širini te boji samog lišća (Miličić, 2016).

Tablica 1. Prikaz karakteristika sorti Drobnice, Lastovke i Oblice

| | SORTA | | |
|-------------------|--|---------------------------------------|--|
| | Drobница | Lastovka | Oblica |
| Stablo | bujno | srednje bujno | srednje bujno |
| Rast | uspravno i visoko | uspravno i nisko | uspravno i nisko |
| Krošnja | prostrana | okrugla do piramidalna | okrugla |
| List | kratak, simetričan, uzak, oštrog vrha | malen, sitan, simetričan, oštrog vrha | veliki, eliptičnog oblika, tupastog vrha |
| Dužina (cm) | 5 | 5,4 | 7,5 |
| Širina (cm) | 1,2 | 1,2 | 1,7 |
| Boja | tamnozelenog lica, svijetlozelenog naličja | tamnozeleno | maslinasto siva do tamnozeleno |
| Rasprostranjenost | Korčula, Rab, Zadarsko područje | Korčula, srednja i južna Dalmacija | cijela primorska Hrvatska |

1.3. Maslinovo lišće

Maslinovo lišće postalo je predmet istraživanja brojnih znanstvenika zbog svojih bioaktivnih tvari koje je moguće primijeniti u raznim industrijama poput farmaceutske, kozmetičke te prehrambene. U brojnim studijama objašnjeni su pozitivni učinci korištenja maslinovog lišća. Sastav maslinovog lišća ovisi o brojnim čimbenicima kao što su starost maslinovog drveta, razdoblje uzorkovanja te klimatski uvjeti (Boudhrioua, et al., 2009). Prosječni sastav maslinovog lišća je: 46,2 – 49,8 % vode, 37,1 – 42,6 % ugljikohidrata, 5,0 – 7,6 % proteina, 2,9 – 4,5 % mineralnih tvari te 1,1% – 1,3% lipida (Ranalli, et al., 2006). Jedna od podjela tvari zastupljenih u maslinovom listu jesu dvije glavne frakcije: lipidna frakcija i na druge spojeve (Talhoui, 2016). Na Slici 1. prikazan je sastav maslinovog lišća i grupe spojeva koje prevladavaju u lišću, a od svih sastojaka posebno se ističu fenolne tvari (Talhoui, 2016).

Sastav maslinovog lišća

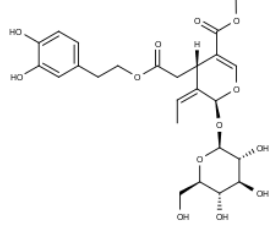
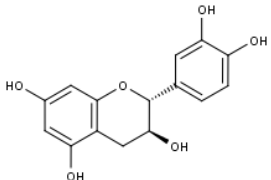
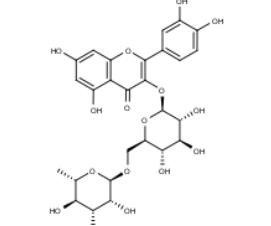
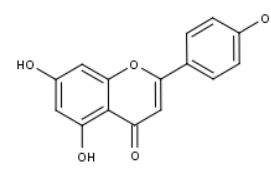
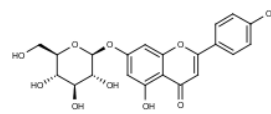
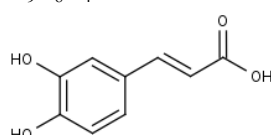
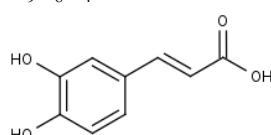
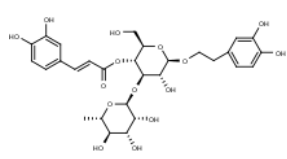
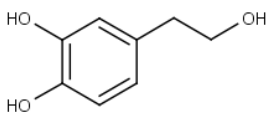
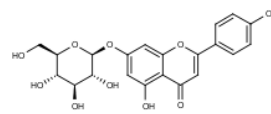
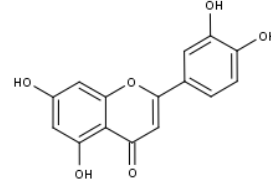
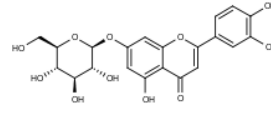
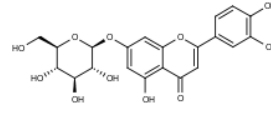
| Lipidna frakcija | Ostale komponente |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">Galaktolipidi (53 %)Neutralni lipidi (25 %)Fosfolipidi (21 %) | <ul style="list-style-type: none">Tokoferoli (41-125 mg/kg)Triterpenski alkoholi (342-837 mg/kg)<ul style="list-style-type: none">Oleinska kiselina (3,0-3,5 % suhe tvari)Pigmenti<ul style="list-style-type: none">Klorofil (11600-16800 mg/kg)Karotenoidi (28-3100 mg/kg)Hlapljive tvariUgljikovodici (2057-3400 mg/kg)<ul style="list-style-type: none">Manitol (8 % m/m)Voskovi (915-1874 mg/kg)Alifatski alkoholi (95- 311 mg/kg)Fenolne tvari ($14 - 82 \times 10^3$ mg/kg suhe tvari) |

Slika 1. Sastav i podjela maslinovog lišća po biološkim komponentama.

1.3.1. Fenolne tvari u maslinovom lišću

Fenolne tvari su sekundarni biljni metaboliti koji na aromatskom prstenu imaju vezanu jednu ili više hidroksilnih skupina. Fenolni spojevi mogu se klasificirati s obzirom na broj fenolnih prstenova, pa se dijele na jednostavne fenole i polifenoli (imaju više povezanih prstenova). Osim toga moguća je podjela ovisno o broju fenolnih prstenova i ovisno o elementima koji međusobno povezuju prstenove. Iako su strukturno različiti, fenolnim prstenovima je zajedničko to što nastaju iz uobičajene C6-C3 fenilpropanoidne jedinice. Proces biosinteze rezultira širokim spektrom biljnih fenola kao što su spojevi: cimeta kiselina (spoj C6-C3), benzojeva kiseline (spoj C6-C1), flavonoidi (spoj C6-C3-C6), proantocijanidi [spojevi (C6-C3-C6)_n], kumarini (spoj C6-C3), stilbeni (spoj C6-C2-C6), lignani (spoj C6-C3-C3-C6) te lignini {spoj [(C6-C3)_n]⁶³} (Talhaoui, 2016).

Od navedenih spojeva značajnih za autohtone sorte maslinovog lišća treba izdvojiti sekoiridoide, flavonoide te jednostavne fenole (fenolni alkoholi i kiseline) (Sahin & Bilgin, 2017).

| | | | |
|---|--|--|---|
| <p>Sekoiridoidi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Oleuropein $C_{25}H_{32}O_{13}$  | <p>Flavonoidi</p> <p>Flavonoli</p> <ul style="list-style-type: none"> • Katehin $C_{15}H_{14}O_6$  <ul style="list-style-type: none"> • Rutin $C_{27}H_{30}O_{16}$  | | <p>Flavoni</p> <ul style="list-style-type: none"> • Apigenin $C_{15}H_{10}O_5$  <ul style="list-style-type: none"> • Apigenin-7-O-glukozid $C_{21}H_{20}O_{10}$  |
| <p>Fenolne kiseline</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ferulična kiselina $C_{10}H_{10}O_4$  <ul style="list-style-type: none"> • Kavaska kiselina $C_9H_8O_4$  <ul style="list-style-type: none"> • Verbaskozid $C_{29}H_{36}O_5$  | <p>Fenolni alkoholi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hidroksitirosol $C_8H_{10}O_3$  <ul style="list-style-type: none"> • Tirozol $C_8H_{10}O_2$  | | <ul style="list-style-type: none"> • Luteolin $C_{12}H_{10}O_6$  <ul style="list-style-type: none"> • Luteolin-7-O-glukozid $C_{21}H_{20}O_{11}$  |
| <p>Hidroksibenzaldehid</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vanilin $C_8H_8O_3$  | | | |

Slika 2. Fenolni spojevi sadržani u maslinovom lišću sorti Drobница, Lastovka i Oblica.
Slike dostupne na <https://www.extrasynthese.com/>

Na Slici 2. prikazani su najčešći fenolni spojevi prisutni u maslinovom lišću, osim kojih se mogu naći i drugi spojevi koji nisu toliko zastupljeni poput benzojeve kiseline, 4-hidroksibenzojeve kiseline i drugih.

1.3.1.1. Sekoiridoidi

Sekoiridoidi su spojevi koji nisu klasične fenolne komponente, ali su rezultat esterifikacije. Glavni predstavnici ove skupine spojeva su oleuropein i ligstrozid čija je koncentracija iznimno velika u plodu i lišću maslina. Oleuropein je spoj koji se može naći isključivo u maslinama i njihovim nusproizvodima, a odgovoran je za gorak okus. Njegov maseni udio može se kretati od 25 mg/kg s.t. do 143 g/kg s.t. lišća. Sekoiridoidi mogu biti zastupljeni u dva oblika, aglikoni i glukozidi (Talhaoui, 2016).

1.3.1.2. Jednostavni fenoli

Grupu jednostavnih fenola koji se nalaze u maslinovom lišću pripadaju fenolne kiseline i fenolni alkoholi koji su odgovorni za senzorska i organoleptička svojstva (okus i gorčina) kao i antioksidativna svojstva maslinovog ulja (Bendini, et al., 2007). Fenolni alkoholi, tirosol i hidroksitirosol, razlikuju se s obzirom na funkcionalnu skupinu ($-H \rightarrow -OH$). Hidroksitirosol nastaje razgradnjom oleuropeina, a njegova se koncentracija u plodovima maslina i lišću povećava zrenjem. Fenolne kiseline (ferulična i kavaska kiselina) su sekundarni metaboliti biljaka koji su široko rasprostranjene, kao i verbaskozid koji je zapravo derivat hidroksitirosola (Talhaoui, 2016).

1.3.1.3. Flavonoidi

Osnovna struktura svih flavonoida su dva povezana aromatska prstena pomoću tri ugljikova atoma. Glavne skupine flavonoida prisutnih u maslinama i njihovim nusproizvodima jesu antocijani, flavonoli, flavanonoli, flavoni i flavanoni. Glavna razlika između skupina je u stupnju oksidacije. Identificirani flavonoidi u maslinovom lišću mogu biti u obliku aglikona

(kverceti, rutin, apigenin) i glukozi (apigenin-7-*O*-glikozid, luteolin-7-*O*-glikozid) (Talhaoui, 2016).

1.3.2. Utjecaj abiotičkih i biotičkih čimbenika na sastav maslinovog lišća

Fenolni spojevi mogu nastati sintezom biljnog tkiva tijekom uobičajenog rasta ili kao odgovor biljke na vanjske čimbenike kao što su nedostatak vode, izloženost solima teških metala, temperatura, UV zračenje). Abiotički čimbenici koji mogu utjecati na sastav su kemijski i fizikalni utjecaji iz okoliša (temperatura, tlak, vlaga, pH, tlo). Suprotno tome, biotički faktori su živi organizmi koji mogu pozitivno, ali najčešće negativno djelovati (gljivice, bakterije, druge biljke i ljudski utjecaj). Starost lišća može značajno promijeniti kvalitativni i kvantitativni sastav lišća, primjerice količina oleuropeina viša je u mladom, nego u starom lišću (Talhaoui, et al., 2015).

1.3.3. Metabolizam fenola

Za razumijevanje biodostupnosti fenolnih spojeva potrebno je poznavati metaboličke procese kojima oni podliježu. Nakon konzumacije, podvrgavaju se metabolizmu te se njihova koncentracija znatno smanjuje. Obzirom da samo se mali dio fenolnih komponenti iz organizma nepromjenjivo eliminira, utjecaj na organizam imaju metaboliti samih spojeva. Iz tog razloga istraživanja su usmjerena na metaboličke procese i na nastale metabolite fenolnih spojeva (Spencer, 2003).

Pri niskom pH želuca, oligomerni proantocijanidi cijepaju se u monomerne jedinice, dok se sve podvrste flavonoida razgrađuju u jejunumu i ileumu tankog crijeva. Dolaskom flavonoidnih metabolita u jetru, oni se dalje metaboliziraju, a preostali dio mikroflora debelog crijeva razgrađuje u fenolne kiseline manje molekulske mase koje su pogodne za apsorpciju. Dio metabolizma fenolnih komponenti odvija se i u drugim stanicama te se eliminira pomoću bubrega (Spencer, 2003).

1.3.4. Metode detekcije fenolnih spojeva

Obzirom na njihovu topljivost fenolni spojevi najčešće se ekstrahiraju mješavinom alkohola (metanol, etanol) i vode, te se razdvajaju i detektiraju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornost (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Tijekom elucije čvrsta faza najčešće je nepolarna te se s toga koristi otapalo koje je boljih polarnih svojstava, to može biti voda, no najčešće se zamjenjuje metanolom. Razlozi korištenja metanola u istraživanjima, kao polarnog otapala, su radi jednostavnosti samog alkohola. Za analizu HPLC-om, najčešće se koristi kombinacija 2 ili više otapala, kako bi se postigla bolja razlučivost i raspoznavanje pojedinih fenolnih komponenti (Mansoor, 2002).

1.4. Praćenje fizikalno-kemijskih parametara

Električna provodljivost je svojstvo otopine da provodi električnu struju koja ovisi o prisutnim ionima u uzorku te se koristi za mjerenje koncentracije iona u otopini. Najčešće se u otopini mogu naći otopljene krute tvar. To su spojevi koji se iz otapala (najčešće vode) ne mogu ukloniti na jednostavne načine zbog stvaranja soli ili spojeva koji disociraju u vodi te formiraju ione. Suha tvar je obično u direktnoj korelaciji s ukupnim otopljenim krutim tvarima, a govori i o samoj čistoći ispitivanog uzorka (Jakelić, et al., 2016). Vrijednost pH govori o kiselosti odnosno lužnatosti otopine i ovisi također o količini otopljenih tvari, tj. koncentraciji H^+ iona u otopini.

1.5. Antioksidacijska aktivnost i antioksidacijski kapacitet

Suvremeni način života dovodi do prekomjerne produkcije slobodnih radikala i reaktivnih oblika kisika (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) u organizmu što rezultira povećanjem oksidativnog stresa i smanjenjem antioksidacijske aktivnosti (Ward, et al., 2004).

Antioksidansi su spojevi koji štite tijelo od slobodnih radikala, preveniraju nastanak antioksidacijskog stresa i povezanih bolesti. Antioksidacijski kapacitet je sposobnost nekog spoja da umanja štetno djelovanje slobodnih radikala. U novije vrijeme, sve su češća istraživanja biljnih infuzija kao izvora antioksidanasa.

Napitci koji mogu ublažiti antioksidacijski stres najčešće su to čajevi i vodene infuzije. Čaj je napitak napravljen isključivo od biljke čajevca te postoje zeleni, crni i oolong. Svi ostali napitci koji se pripremaju od drugih biljaka su u vodene infuzije (Znate li razliku između čaja i toplog napitka?, 2018).

1.5.1. Antioksidacijska aktivnost vodenih infuzija i metanolnih ekstrakata maslinovog lišća

Dobivanje infuzija zapravo je postupak ekstrakcije čvrsto/tekuće pri čemu tvari iz krutog sastojka (usitnjenog ili krupnog biljnog materijala) prelaze u otopinu. Otopina može biti bilo koje otapalo u kojemu su tvari topljive. Tijekom određenog vremena namakanja biljnog materijala topljive tvari prelaze iz čvrste faze u otapalo koje poprima njihova svojstva (Berkem, 2018). Za pripremu čajeva i infuzija najčešće se koristi voda koja je najjeftinije i najdostupnije polarno otapalo.

Najčešći način određivanja antioksidacijskog kapaciteta je pomoću slobodnog DPPH radikala te FRAP metode (eng. *Ferric reducing ability of plasma*) dok se za kvantifikaciju antioksidacijskog kapaciteta koristi standardna tvar Trolox te se antioksidacijski kapacitet najčešće iskazuje u Trolox ekvivalentima (eng. *Trolox equivalent antioxidant capacity*, TEAC) (Kovačić, et al., 2017).

1.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Metoda DPPH, obzirom na mehanizam, pripada SET metodi (eng. *Slow electron transport*). SET metode temelje se na određivanju antioksidansa pomoću transporta elektrona koji ima mogućnost redukcije oksidativne tvari. Odvijanje reakcije relativno je sporo i ovisi o pH vrijednosti (Prior, et al., 2005).

DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) je organski dušikov spoj, relativno vremenski stabilan. Sposobnost spojeva da reduciraju DPPH određuje se spektrofotometrijski na valnoj duljini 515-528 nm, a očituje se promjenom boje iz tamnoljubičaste do različitih nijansi žute boje. Postotak gašenja slobodnog DPPH radikala ekvivalentan je koncentraciji antioksidansa (Brand-Williams, et al., 1995).

Za izradu baždarnog pravca sa svrhom kvantifikacije antioksidacijskog kapaciteta, umjesto askorbinske kiseline, može se koristiti Trolox. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina) je analog vitamina E, dobro topljiv u vodi, a koristi se kod bioloških ili biokemijskih testova za mjerenje oksidativnog stresa i oštećenja stanica (Abera, 2018).

1.6. Pozitivni zdravstveni učinci konzumacije infuzija od maslinovog lišća

Maslinovo lišće bogat je izvor polifenola koji imaju mogućnost zahvaćanja slobodnih radikala te tako ograničavaju nastalu štetu. Upravo zbog toga polifenolima se pripisuje zdravstvena korist i njihov efekt kod starenja (smanjuju starenje kože i stanica). Njihova dostupnost ovisi o načinu čuvanja, načinu pripreme, ali i namirnici koja se obrađuje (Berkem, 2018). Vodene infuzije maslinovog lišća bogat su izvor fenolnih tvari, a sve se više upotrebljavaju kao zamjena za zeleni čaj jer ne sadrže kofein (Basuny & Arafar, 2018).

1.6.1. Antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća

Brojna istraživanja provedena su kako bi se ustanovio sastav i djelovanje fenola dostupnih u maslinovom lišću, no većina je usmjerena na određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Djelovanje individualnih fenolnih komponenti može biti promijenjeno obzirom na uvjete pripreme (vrijeme i temperatura), načinu sušenja, čuvanja, granulaciji lišća od kojeg se priprema infuzija kao i podneblju uzorkovanja (Kovačić, et al., 2017; Casazza, et al., 2017).

Fenoli imaju visok antioksidacijski kapacitet zbog čega se očituje njihov učinak na ljudsko zdravlje. Istraživanjem flavonoida, dokazano je da rutin, katehin i luteolin imaju gotovo dva i pol puta veću antioksidacijsku aktivnost, nego li vitamin C i E (Braun & Cohen, 2015). Antioksidacijska aktivnost oleuropeina i hidroksitirosola jednaka je aktivnosti vitamina C i E (Savarese, et al., 2007). Istraživanjem je otkriven redoslijed fenola obzirom na relativnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala: rutin > katehin \cong luteolin > ekstrakt maslinovog lišća \cong hidroksitirosol > diosmetin > kavaska kiselina > verbaskozid > oleuropein > luteolin-7-*O*-glukozid \cong vanilinska kiselina \cong diosmetin-7-*O*-glukozid > apigenin-7-*O*-glukozid > tirosol > vanilin (Benavente-Garcia, et al., 2000). Prema navedenom, antioksidacijski kapacitet ekstrakta maslinovog lišća veći je od mnogih antioksidansa vjerojatno zbog sinergističkog učinka sekoiridoida, flavonoida i drugih fenola prisutnih u ekstraktu.

1.6.2. Drugi zdravstveni učinci

U prekliničkim istraživanjima dokazan je zdravstveni učinak biofenola, kao što su oleuropein i hidroksitirosol. Navedeni spojevi inhibiraju bakrov sulfat koji uzrokuje oksidaciju niskomolekularnih lipoproteina. Istraživanjem je ustanovljeno vazodilacijsko djelovanje, antitrombocitni kao i antiinflamatorni učinak (Bullota, et al., 2014).

Maslinovo lišće kroz povijest koristilo se u brojne svrhe pa tako i za liječenje infektivnih bolesti uzrokovanih bakterijama, gljivicama, plijesnima i virusima (Sahin & Bilgin, 2017). Najčešće su vodene infuzije korištene za liječenje bakterijskih bronhitisa i tonzilitisa te gljivičnih infekcija spolnog sustava kod žena te virusnih infekcija mokraćnog sustava (Guinda, 2006) (Braun & Cohen, 2015) (Benavente-Garcia, et al., 2000).

U *in vivo* uvjetima dokazano je da konzumacija maslinovog lišća snižava krvni tlak. Provedenim istraživanjima dokazano je da konzumacija vodenih infuzija maslinovog lišća kod ljudi ima antihipertenzijski učinak i snižava kolesterol (Sahin & Bilgin, 2017).

Glavne tvari odgovorne za hipoglikemijsku aktivnost vezane su za oleuropein i njegove derivate. Ti spojevi pokazuju i antidijabetičku aktivnost na životinjskim modelima djelujući na dva mehanizma: otpuštanje inzulina pod djelovanjem glukoze i perifernom konzumacijom glukoze (Sahin & Bilgin, 2017).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je odrediti fenolni sastav maslinovog lišća autohtonih sorti (Drobnice, Lastovke i Oblice) te njihovih vodenih infuzija pripremanih na tri različita načina. Istraženi su hladni postupak pripreme (25 °C/30 min) i topli primjenom dviju temperatura (75 °C i 100 °C, uz vrijeme pripreme od 3 min) te njihov utjecaj na učinkovitost ekstrakcije fenola u vodene otopine i antioksidacijski kapacitet infuzija.

Također, pripremljenim infuzijama određene su i fizikalno-kemijske karakteristike (udio topljive suhe tvari, pH vrijednost i električna provodljivost) s ciljem usporedbe različitih uvjeta pripreme.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci maslinovog lišća

Za pripremu infuzija u ovom radu korišteno je maslinovo lišće autohtonih sorti Drobnice, Lastovke i Oblice. Lišće je uzorkovano u ekološkom masliniku u Metkoviću podignutom 2009. godine. Uzorkovanje lišća provedeno je tijekom zimskog mirovanja masline (studeni 2017. godine). Za uzorkovanje lišća pojedine sorte odabrana su tri zdrava stabla u nizu koja su kondicijski najbolje ocijenjena. Sa svakog stabla uzorkovano je ukupno 200 listova tako da je sa sjeverne, južne, istočne i zapadne strane stabla uzeto po 50 listova. Listovi su uzorkovani sa srednjeg dijela mladica ili jednogodišnjih izboja.



Slika 3. Prikaz osušenog lišća sorti a) Drobница b) Lastovka i c) Oblica.

Listovi uzorkovani sa tri stabla sušeni su na zraku te su dobro izmiješani da bi se dobio homogeni i reprezentativni uzorak pojedine sorte. Osušeno lišće istraživanih sorti prikazano je na Slici 3.

3.1.2. Kemikalije i standardi

Za ekstrakciju i određivanje sastava fenolnih tvari u lišću i pripremljenim vodenim infuzijama korištene su sljedeće kemikalije:

- metanol, HPLC gradient grade; Merck KgaA, Njemačka (100 % i 80 %, V:V),
- acetonitril, HPLC gradient grade; Merck KgaA, Njemačka,
- fosforna kiselina, Sigma-Aldrich, SAD (2 %-tna vodena otopina, V:V).

Sljedeće standardne tvari korištene su za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih fenolnih tvari u lišću i vodenim infuzijama:

- oleuropein HPLC čistoće ≥ 98 %, apigenin HPLC čistoće ≥ 99 %, apigenin-7-*O*-glukozid HPLC čistoće ≥ 99 %, luteolin HPLC čistoće ≥ 99 %, luteolin-7-*O*-glukozid HPLC čistoće ≥ 98 %, katehin HPLC čistoće ≥ 99 %, rutin HPLC čistoće ≥ 99 %, hidrositirosol HPLC čistoće ≥ 98 %, tirosol HPLC čistoće ≥ 99 %, ferulična kiselina HPLC čistoće ≥ 90 %, kavaska kiselina HPLC čistoće ≥ 99 %, verbaskozid HPLC čistoće ≥ 99 %, vanilin HPLC čistoće ≥ 99 %

Svi standardi fenolnih tvari bili su od proizvođača Extrasynthese (Francuska).

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih infuzija korištena su sljedeća otapala i standardne tvari:

- metanol, HPLC gradient grade, Prolabo BDH, Engleska (99,8 %),
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina): Sigma-Aldrich, SAD,
- slobodni radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), Sigma-Aldrich, SAD.

3.1.3. Uređaji i pribor

Za pripremu ekstrakta fenola iz lišća i vodenih infuzija korišteni su sljedeći uređaji:

- aparat za mljevenje, tip 8832-D, Casa nuova, Kina,
- semimikro analitička vaga, Mettler Toledo, Švicarska,
- električni grijači s kalotama, INKO, Hrvatska,
- ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex Digitec, Njemačka (140/560 W, 35 kHz),
- centrifuga, Bench-top Versatil, Electra Medical Corporation, SAD,
- vodena kupelj, IKA HB10 Digital, Njemačka,
- Vortex-labdancer, IKA, Njemačka,
- sterilizator – sušionik ST-80, INKO, Hrvatska.

Analitička mjerenja provedena su s instrumentima:

- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti UltiMate 3000 (Dionex, TermoFisher Scientific, SAD) s UV-VIS detektorom (UltiMate 3000 VWD Variable Wavelength Detector),
- spektrofotometar HACH DR/400, Colorado, SAD,
- konduktometar SevenEasy, Mettler Toledo, Švicarska,
- pH-metar S20, SevenEasy, Mettler Toledo, Švicarska.

U radu je korišten sljedeći pribor i potrošni materijal:

- automatske pipete, Eppendorf Research, Njemačka,
- aluminijske posudice s poklopcem (za sušenje),
- viala volumena 2 mL, PTFE/silikonske septe promjera 8 mm i polipropilenski čepovi s otvorom 8 mm za viala (Restek, SAD),

- disk filtri od celuloznog acetata (promjera 13 mm, veličina pora 0,45 μm), Filtres Fio-roni, Francuska,
- plastični pribor: samostojeće Falcon epruvete od 50 mL, plastične epruvete od 15 mL s čepovima na navoj, šprice s iglama od 2 mL, cjedila,
- stakleni pribor: okrugle tikvice s ravnim dnom (250 mL), odmjerne tikvice (50 i 100 mL), staklene čaše (50 mL, 100 mL, 250 mL), staklene teglice (50 mL) s čepovima na navoj, staklene epruvete od 15 i 20 mL s PP čepovima na navoj (Duran, Njemačka), trbušaste pipete (20 mL), menzure, staklena lađica za vaganje, Pasteur pipete, eksikator, kivete za spektrofotometrijsko mjerenje od optičkog stakla (1 cm) sa plastičnim čepovima,
- ostali pribor i materijal: grubi filtarski papir, kvarcni pijesak, metalne žlice i špatule, gumene propipete, stalci za epruvete, termometri.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema maslinovog lišća za analize

Nakon uzorkovanja i transporta u laboratorij maslinovo lišće svake sorte isprano je vodom iz slavine. Lišće je potom kratko uronjeno u posudu s 1 %-tnom otopinom octene kiseline (V:V, pripremljena iz ledene octene kiseline, VWR Chemicals, Engleska) te je dobro isprano u destiliranoj vodi i ostavljeno na cijedenju. Oprano lišće obrisano je papirnatim ubrusima i sušeno na zraku u sobnim uvjetima. Do trenutka pripreme ekstrakta fenolnih tvari i pripreme infuzija, lišće je čuvano zaštićeno od svjetla (u papirnatim vrećicama) na sobnoj temperaturi.

3.2.2. Ekstrakcija fenolnih tvari iz maslinovog lišća

Ekstrakcija fenolnih tvari provedena je prema postupku koji su opisali Marinova i sur. (2005). U staklenu teglicu s čepom na navoj odvagano je 0,25 g usitnjenog maslinovog lišća na koje je dodano 20 mL 80 %-tnog metanola (V:V). Tako pripremljeni uzorci preneseni su u ultrazvučnu kupelj i ekstrahirani 20 minuta. Po završetku ekstrakcije uzorci su temperirani na 20 ± 2 °C u vodenoj kupelji jer su se prilikom ultrazvučne ekstrakcije zagrijali. Metanolni ekstrakti (13,5 mL) preneseni su u plastične epruvete s čepovima na navoj i centrifugirani na 4000 o/min u trajanju 7 minuta. Izbistreni ekstrakti pažljivo su preneseni u staklene epruvete s čepom te su pripremljeni za analizu tekućinskom kromatografijom.

3.2.3. Priprema vodenih infuzija maslinovog lišća

Lišće za pripremu infuzija usitnjavano je točno 30 sekundi u električnom aparatu za mljevenje. Vodene infuzije pripremane su na dva načina: hladnim i toplim postupkom. Infuzije su pripremane prelijevanjem 1,00 g maslinovog lišća s 200 mL vode (sobne temperature 24 ± 1 °C ili vode zagrijane na 75 °C ili 100 °C) i namakanjem u trajanju 30 minuta kod hladne pripreme te 3 minute kod tople pripreme. Nakon prelijevanja lišća vodom, staklene čaše su poklopljene satnim stakalcima i stavljene u termostatiranu vodenu kupelj. Po isteku vremena pripreme, infuzije su filtrirane preko cjedila za čaj prekrivenim grubim filtarskim papirom. Postupak pripreme za svaku sortu lišća i temperaturu pripreme proveden je u tri ponavljanja. Profiltrirani uzorci infuzija izbistreni su centrifugiranjem na 4000 o/min kroz 7 minuta u plastičnim epruvetama s čepom. Izbistrene infuzije pažljivo su prenesene u staklene epruvete s čepom te su pripremljene za analizu tekućinskom kromatografijom.



Slika 4. Primjer osušenog i usitnjenog lišća sorti a) Drobница b) Lastovka i c) Oblica (vlastiti izvor)

Na Slici 4. prikazano je osušeno i usitnjeno lišće sorti Drobница, Lastovka i Oblica koje je korišteno za pripremu vodenih infuzija i metanolnih ekstrakata.

3.2.4. Priprema ekstrakta fenolnih tvari i vodenih infuzija za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Izbistreni metanolni ekstrakti fenolnih tvari i vodene infuzije profiltrirani su preko disk filtra od celuloznog acetata (prethodno navlaženog odgovarajućim otapalom) u staklene viala volumena od 2 mL. Viala su začepljene septama i polipropilenskim čepovima za viala.

3.2.5. Određivanje suhe tvari infuzija standardnom metodom sušenja

Udio ukupne suhe tvari u infuzijama određen je standardnom metodom sušenja na 105 °C. Kvarcnim pijeskom prekriveno je dno aluminijske posudice koja je s poklopcem stavljena na sušenje sat vremena. Nakon sušenja, ohlađenoj posudici zabilježena je masa te je dodano 3 mL uzorka infuzije, zatim je ponovljeno vaganje i sušenje u trajanju od 4 sata. Osušena posudica nakon hlađenja u eksikatoru izvagana je da bi se odredila konačna masa uzorka nakon sušenja. Udio suhe tvari (%) koja je prilikom pripreme prešla u vodenu otopinu infuzija izračunat je dijeljenjem mase uzorka nakon sušenja i prije sušenja te množenjem sa 100.

3.2.6. Određivanje električne provodljivosti i pH vrijednosti infuzija

Za određivanje pH vrijednosti i električne provodljivosti korišten je pH-metar i konduktometar marke *SevenEasy* (Mettler Toledo, Švicarska). Neposredno prije provedenih mjerenja, uređaji su bili kalibrirani prema uputama proizvođača standardnim otopinama poznate pH vrijednosti i električne provodljivosti. Elektrode uređaja su isprane destiliranom vodom te u nekoliko navrata uzorkom infuzije i zatim uronjene u infuziju. Po završetku mjerenja očitana je vrijednost i temperatura.

3.2.7. Određivanje sastava fenolnih tvari tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Analiza pojedinačnih fenola provedena je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) s UV-VIS detektorom. Uređaj je opremljen s automatskim sustavom za uzimanje uzoraka (autosampler) i binarnom pumpom koja pokreće pokretnu fazu (eluens) koja se sastojala od dvije tekuće faze: (A) 0,2 % fosforna kiselina (V:V) te (B) mješavina metanola i acetonitrila (1:1, V:V). Otapala su prethodno degazirana da bi se uklonili zaostali mjehurići zraka koji mogu omesti analizu. Pumpe dovode otapala u miješalicu gdje se miješaju u različitim omjerima. Uzorak s kolone eluiran je gradijentno, a primijenjeni uvjeti prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Promjena sastava mobilne faze tijekom gradijentnog eluiranja.

| Vrijeme elucije (min) | Udio otapala A (%) (fosforna kiselina) | Udio otapala B (%) (metanol:acetonitril, 1:1) |
|-----------------------|---|--|
| 0 – 0,5 | 90 | 10 |
| 0,5 – 25 | 90 – 83,5 | 10 – 16,5 |
| 25 – 80 | 83,5 – 70 | 16,5 – 30 |
| 80 – 95 | 70 – 0 | 30 – 100 |
| 95 – 100 | 0 | 100 |
| 100 – 102 | 0 – 90 | 100 – 10 |
| 102 – 105 | 90 | 10 |

Vrijeme uspostavljanja ravnoteže bilo je 10 minuta, dok je ukupno vrijeme analize bilo 105 minuta. Brzina protoka mobilnih faza iznosila je 0,8 mL/min.. Volumen injektiranog uzorka bio je 10 µL. Za razdvajanje fenolnih spojeva korištena je C18 kolona obrnutih faza (Lichrospher 100 RP-18, 250 mm × 4 mm, 5 µm), a ispred nje nalazila se predkolona Lichrospher 100 (4 × 4 mm, 5 µm) (Agilent Technologies, SAD). Temperatura tijekom analize je bila 25 °C, a detekcija je izvršena pomoću standardnog UV/VIS detektora pri valnim duljinama prikazanim u Tablici 3.

Tablica 3. Valne duljine UV-VIS detekcije fenolnih spojeva.

| Valna duljina | 250 nm | 280 nm | 305 nm | 370 nm |
|---------------|--|--|--|-------------------|
| Fenolni spoj | Oleuropein Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid | Katehin Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid Hidroksitirosol Tirosol Vanilin | Apigenin Ferulična kiselina Kavska kiselina Verbaskozid | Luteolin Rutin |

Identifikacija pojedinih fenolnih spojeva provedena je usporedbom s vremenom zadržavanja čistih standardnih tvari. Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda. Standardi fenolnih tvari otopljeni su u 80 %-tnom metanolu (V:V) te je za svaki pripremljeno po pet otopina u rasponu masenih koncentracija od 0,5 mg/L do 50 mg/L. Pomoću programskog paketa *Cromleon Chromatography Data System* (verzija programske podrške 7.2 SR4, TermoFisher Scientific, SAD) izrađeni su baždarni pravci nanošenjem poznatih koncentracija standardnih tvari na os x i površine pikova na os y. Maseni udjeli fenolnih tvari izračunati su pomoću baždarnih pravaca za svaku fenolnu tvar i preračunavanjem na masu lista uzetu u ekstrakciju ili za pripremu infuzija.

Prijelaz fenolnih tvari iz lišća u vodene infuzije iskazan je u postocima i izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ prijelaza} = \frac{\gamma_{\text{fenola u infuziji}} \times V_{\text{infuzija}}}{\gamma_{\text{fenola u ekstraktu}} \times V_{\text{ekstrakta}}} \times 100;$$

gdje je:

- γ – masena koncentracija fenola u infuziji odnosno metanolnom ekstraktu
- V – volumen infuzije odnosno metanolnog ekstrakta.

3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta infuzija metodom DPPH

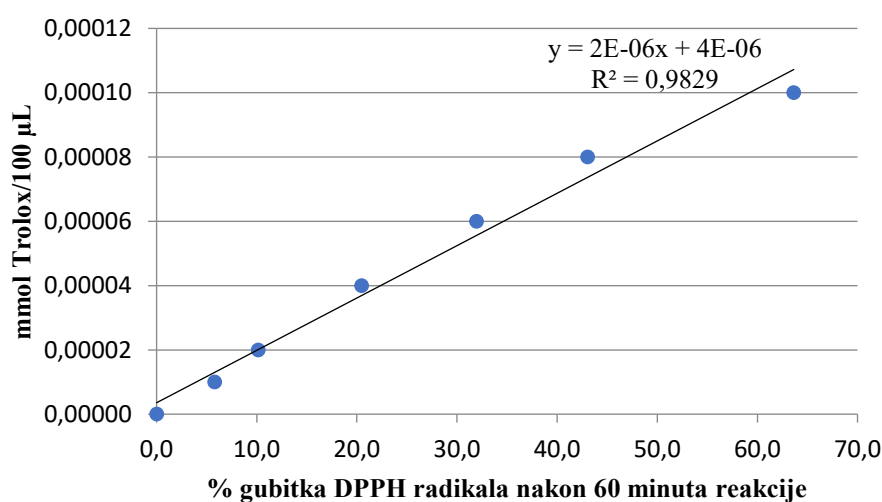
Antioksidacijski kapacitet infuzija određen je prema metodi koju su opisali Brand-Williams i sur. (1995). Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta pripremljena je svježa otopina slobodnog radikala DPPH• koncentracije 0,094 mM u metanolu. U staklenu epruvetu otpipetirano je 3,9 mL otopine DPPH• te je dodano 100 μ L uzorka prikladno razrijeđene infuzije i dobro homogenizirano na Vortex uređaju (10 s). Reakcija gašenja slobodnog radikala se odvijala u tami, u trajanju od sat vremena, nakon čega su izmjerene apsorbancije na valnoj duljini od 515 nm u kivetu od optičkog stakla. Smanjenje apsorbancije izračunato je u odnosu na otopinu slobodnog DPPH• radikala bez infuzije (A_{SP_DPPH} - dobiveno miješanjem 3,9 mL otopine DPPH• i 100 μ L metanola) i preračunato u postotak gubitka radikala sljedećim izrazom:

$$\% \text{ gubitka} = \frac{A_{SP_DPPH} - A_{\text{infuzija}}}{A_{SP_DPPH}} \times 100;$$

gdje je:

- A_{SP_DPPH} – apsorbancija otopine radikala bez infuzije
- A_{infuzija} – apsorbancija infuzije s otopinom radikala nakon 60 minuta reakcije u tami.

Za izradu baždarnog pravca korištena je metanolna otopina standardnog antioksidansa Troloxa (vodotopivi analog vitamina E). Pripremljeno je šest otopina Troloxa u rasponu koncentracija od 0,1 do 1 mM razrjeđivanjem matične otopine (0,0125 g Troloxa u 50 mL metanola). Reakcija otopine Trolox standarda i slobodnog DPPH• radikala provedena je na isti način kao i ranije opisano određivanje s uzorcima infuzija. Za svaku koncentraciju otopine Troloxa provedena je reakcija sa slobodnim DPPH• radikalom u dva ponavljanja. Na temelju izmjerenih apsorbancija izračunat je postotak gubitka slobodnog radikala u reakciji sa standardnim antioksidansom u odnosu na otopinu slobodnog DPPH• radikala bez standarda ($SP_{DPPH\bullet}$). Nacrtnan je baždarni pravac nanošenjem % gubitka radikala na os-x i poznatih koncentracija otopina Troloxa na os-y (Slika 5). Antioksidacijski kapacitet infuzija izračunat je uvrštavanjem postotka gubitka radikala i jednadžbu kalibracijskog pravca i dijeljenjem s masom suhog lišća u reakciji (g) i preračunavanjem na volumen infuzije (200 mL).



Slika 5. Kalibracijski pravac za izračun antioksidacijskog kapaciteta infuzija.

3.2.9. Statistička analiza rezultata

Rezultati eksperimentalnih mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost triju određivanja (tri postupka pripreme × jedno analitičko određivanje) uz pripadajuće standardne

devijacije. Rezultati masenih udjela fenolnih tvari, udjela suhe tvari u infuzijama, pH vrijednosti i električne provodljivosti infuzija testirani su pomoću jednosmjerne analize varijance (*one-way ANOVA*). Srednje vrijednosti rezultata uspoređivane su pomoću Tukeyevog testa značajnih razlika – *The Tukey's honest significant difference test - HSD* ($p < 0,05$), a homogenost varijance testirana je *Brown-Forsythe* testom. Korelacije između pojedinih fenolnih tvari u infuzijama, temperature pripreme, antioksidacijskog kapaciteta i fizikalno-kemijskih svojstava infuzija utvrđene su izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije. Svi statistički testovi provedeni su pomoću programskog paketa *Statistica* verzija 13.3. (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija – SAD). Za izradu grafičkih prikaza i pripremu rezultata prije statističke obrade korišten je *Microsoft Office Excel 2016*.

4. REZULTATI

4.1. Fenolni sastav lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica

U Tablici 4 prikazani su maseni udjeli pojedinih fenolnih tvari u metanolnom ekstraktu sorti Drobnice, Lastovke i Oblice dobiveni HPLC/UV-VIS analizom.

Tablica 4. Maseni udjeli fenolnih tvari u lišću Drobnice, Lastovke i Oblice (mg/g s.t. lišća).

| Fenolna tvar (mg/g s.t.) ¹ | Sorta | | |
|--|----------------|----------------|------------------|
| | Drobница | Lastovka | Oblica |
| Oleuropein | 70,58 ± 1,36 a | 74,24 ± 2,09 a | 95,44 ± 5,87 b |
| Apigenin | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,002 ± 0,0001 b |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid | 0,29 ± 0,01 a | 0,30 ± 0,01 a | 0,32 ± 0,08 a |
| Luteolin | 0,25 ± 0,01 a | 0,22 ± 0,01 b | 0,15 ± 0,01 c |
| Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid | 4,66 ± 0,13 a | 5,84 ± 0,21 b | 7,11 ± 0,08 c |
| Katehin | 0,38 ± 0,01 a | 0,38 ± 0,01 a | 0,49 ± 0,00 b |
| Rutin | 1,24 ± 0,01 a | 0,58 ± 0,08 b | 0,92 ± 0,15 c |
| Hidroksitirosol | 0,41 ± 0,02 a | 0,35 ± 0,01 b | 0,33 ± 0,01 b |
| Tirosol | 0,04 ± 0,01 a | 0,08 ± 0,02 a | 0,06 ± 0,02 a |
| Ferulična kiselina | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a |
| Kavska kiselina | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,02 ± 0,00 a |
| Verbaskozid | 0,99 ± 0,01 a | 0,69 ± 0,05 b | 0,84 ± 0,05 c |
| Vanilin | 0,01 ± 0,00 a | 0,02 ± 0,01 a | 0,04 ± 0,00 b |

¹Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri postupka pripreme × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija; s.t. = suha tvar. Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima u istom retku ukazuju na statistički značajne razlike između sorti s obzirom na udio pojedinih fenola (Tukeyev test, $p < 0,05$)

4.2. Utjecaj temperature pripreme na fizikalno-kemijska svojstva infuzija maslinovog lišća

U Tablici 5 prikazane su vrijednosti pojedinih fizikalno-kemijskih parametara vodenih infuzija od lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica s obzirom na različitu temperaturu pripreme.

Tablica 5. Udio suhe tvari, pH vrijednost i električna provodljivost infuzija od maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice dobivenih hladnom i toplom pripremom.

| Sorta | Fizikalno-kemijski pokazatelj | Temperatura/vrijeme pripreme ¹ | | |
|-----------------|-------------------------------|---|----------------|---------------|
| | | 25 °C/ 30 min | 75 °C/ 3 min | 100 °C/3 min |
| Drobница | udio s.t. (%) | 0,11 ± 0,02 a | 0,12 ± 0,02 a | 0,19 ± 0,05 a |
| | pH vrijednost | 5,62 ± 0,05 a | 5,47 ± 0,02 b | 5,33 ± 0,01 c |
| | el. pr. (μS/cm) ² | 164,3 ± 15,4 a | 156,9 ± 4,5 a | 165,2 ± 7,3 a |
| Lastovka | udio s.t. (%) | 0,09 ± 0,01 a | 0,10 ± 0,01 a | 0,09 ± 0,03 a |
| | pH vrijednost | 5,51 ± 0,04 a | 5,43 ± 0,02 b | 5,44 ± 0,01 b |
| | el. pr. (μS/cm) | 167,5 ± 2,9 a | 182,7 ± 13,0 a | 189,0 ± 1,8 b |
| Oblica | udio s.t. (%) | 0,12 ± 0,01 ab | 0,11 ± 0,01 b | 0,14 ± 0,00 a |
| | pH vrijednost | 5,70 ± 0,02 a | 5,67 ± 0,03 a | 5,58 ± 0,02 b |
| | el. pr. (μS/cm) | 180,4 ± 2,1 a | 172,7 ± 5,1 a | 178,6 ± 5,2 a |

¹ Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri postupka pripreme infuzija × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima u istom retku unutar jedne sorte ukazuju na statistički značajnu razliku između temperatura pripreme (Tukeyev test, $p < 0,05$).

² el. pr. – električna provodljivost

4.3. Utjecaj temperature pripreme na sastav fenola u infuzijama maslinovog lišća

Drobnice, Lastovke i Oblice

U Tablicama 6, 7 i 8 prikazane su masene koncentracije pojedinih fenolnih tvari u vodenim infuzijama sorti Drobnica, Lastovka te Oblica dobivenih hladnom (25 °C/30 min) i toplom pripremom (75 °C/3 min i 100 °C/3 min). Na Slikama 6, 7 i 8 prikazani su prijelazi pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobnica, Lastovka i Oblica u vodene infuzije prilikom pripreme na 25 °C (30 min.), na 75 °C (3 min.) i na 100 °C (3 min.), u odnosu na ekstrakciju metanolom. Tablica 9 prikazuje sumu masenih koncentracija hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u jednoj šalici (200 mL) infuzija maslinovog lišća sorti Drobnica, Lastovka i Oblica.

Tablica 6. Masene koncentracije fenolnih tvari (mg/200 mL) u infuzijama od maslinovog lišća sorte Drobnica dobivenih hladnom i toplom pripremom.

| Fenolna tvar (mg/200 mL) | Temperatura/vrijeme pripreme ¹ | | |
|--------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | 25 °C/ 30 min | 75 °C/ 3 min | 100 °C/3 min |
| Oleuropein | 28,24 ± 1,30 a | 44,15 ± 5,13 b | 55,57 ± 3,58 c |
| Apigenin | 0,001 ± 0,000 a | 0,002 ± 0,000 a | 0,002 ± 0,000 a |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid | 0,07 ± 0,00 a | 0,17 ± 0,03 b | 0,18 ± 0,01 b |
| Luteolin | 0,02 ± 0,00 a | 0,06 ± 0,01 b | 0,13 ± 0,02 c |
| Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid | 1,43 ± 0,05 a | 2,65 ± 0,23 b | 3,17 ± 0,26 c |
| Katehin | 0,30 ± 0,03 a | 0,29 ± 0,03 a | 0,32 ± 0,01 a |
| Rutin | 0,75 ± 0,04 a | 0,98 ± 0,01 b | 1,05 ± 0,04 b |
| Hidroksitirosol | 0,25 ± 0,01 a | 0,35 ± 0,02 b | 0,44 ± 0,01 c |
| Tirosol | 0,11 ± 0,01 a | 0,11 ± 0,00 a | 0,12 ± 0,02 a |
| Ferulična kiselina | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a |
| Kavska kiselina | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a |
| Verbaskozid | 0,08 ± 0,05 a | 0,48 ± 0,04 b | 0,89 ± 0,08 c |
| Vanilin | 0,02 ± 0,00 a | 0,02 ± 0,01 a | 0,02 ± 0,00 a |

¹Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri postupka pripreme infuzija × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima u istom retku ukazuju na statistički značajnu razliku između temperatura pripreme (Tukeyev test, $p < 0,05$).

Tablica 7. Masene koncentracije fenolnih tvari (mg/200 mL) u infuzijama od maslinovog lišća sorte Lastovka dobivenih hladnom i toplom pripremom.

| Fenolna tvar (mg/200 mL) | Temperatura/vrijeme pripreme ¹ | | |
|--------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | 25 °C/ 30 min | 75 °C/ 3 min | 100 °C/3 min |
| Oleuropein | 20,49 ± 1,24 a | 32,61 ± 1,01 b | 41,68 ± 3,61 c |
| Apigenin | 0,005 ± 0,001 a | 0,005 ± 0,001 a | 0,008 ± 0,002 a |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid | 0,05 ± 0,00 a | 0,09 ± 0,01 b | 0,18 ± 0,02 c |
| Luteolin | 0,04 ± 0,01 a | 0,05 ± 0,00 a | 0,09 ± 0,01 b |
| Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid | 1,79 ± 0,15 a | 2,83 ± 0,14 b | 4,05 ± 0,29 c |
| Katehin | 0,35 ± 0,01 a | 0,38 ± 0,02 ab | 0,39 ± 0,01 b |
| Rutin | 0,59 ± 0,01 a | 0,69 ± 0,05 ab | 0,74 ± 0,06 b |
| Hidroksitirosol | 0,35 ± 0,02 a | 0,52 ± 0,01 b | 0,65 ± 0,06 c |
| Tirosol | 0,12 ± 0,01 a | 0,11 ± 0,02 a | 0,15 ± 0,03 a |
| Ferulična kiselina | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a |
| Kavska kiselina | n.d. ² | n.d. | n.d. |
| Verbaskozid | 0,64 ± 0,06 a | 1,47 ± 0,34 b | 1,99 ± 0,15 b |
| Vanilin | 0,02 ± 0,01 a | 0,01 ± 0,00 a | 0,01 ± 0,00 a |

¹Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri postupka pripreme infuzija × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima u istom retku ukazuju na statistički značajnu razliku između temperatura pripreme (Tukeyev test, $p < 0,05$).

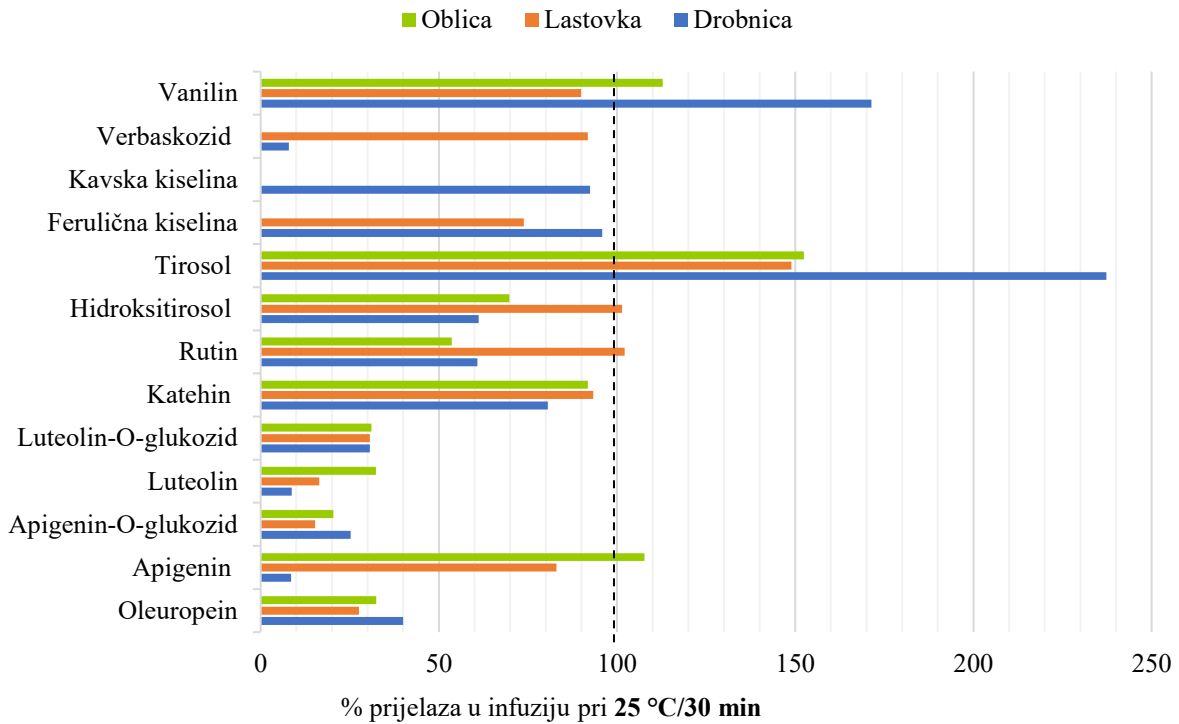
²n.d. – nije detektirano

Tablica 8. Masene koncentracije fenolnih tvari (mg/200 mL) u infuzijama od maslinovog lišća sorte Oblica dobivenih hladnom i toplom pripremom.

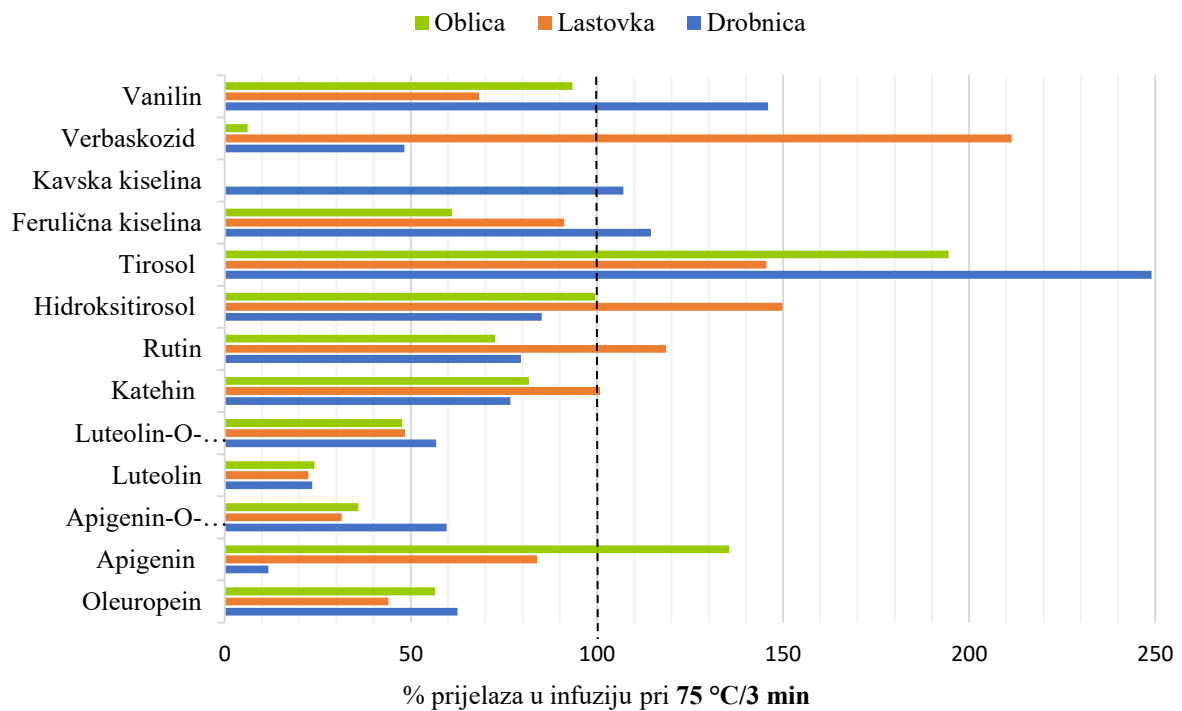
| Fenolna tvar (mg/200 mL) | Temperatura/vrijeme pripreme ¹ | | |
|--------------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | 25 °C/ 30 min | 75 °C/ 3 min | 100 °C/3 min |
| Oleuropein | 30,95 ± 2,90 a | 53,90 ± 2,27 b | 56,92 ± 5,81 b |
| Apigenin | 0,002 ± 0,000 a | 0,003 ± 0,002 a | 0,004 ± 0,001 a |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid | 0,07 ± 0,01 a | 0,11 ± 0,01 a | 0,08 ± 0,07 a |
| Luteolin | 0,05 ± 0,00 a | 0,04 ± 0,00 b | 0,04 ± 0,00 ab |
| Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid | 2,21 ± 0,13 a | 3,39 ± 0,22 b | 3,52 ± 0,42 b |
| Katehin | 0,45 ± 0,01 a | 0,40 ± 0,01 b | 0,40 ± 0,01 b |
| Rutin | 0,49 ± 0,04 a | 0,67 ± 0,05 b | 0,62 ± 0,02 b |
| Hidroksitirozol | 0,23 ± 0,01 a | 0,33 ± 0,01 b | 0,36 ± 0,04 b |
| Tirosol | 0,09 ± 0,01 a | 0,11 ± 0,02 ab | 0,13 ± 0,02 b |
| Ferulična kiselina | n.d. ² | n.d. | n.d. |
| Kavska kiselina | n.d. | n.d. | n.d. |
| Verbaskozid | n.d. | 0,05 ± 0,03 a | 0,43 ± 0,04 b |
| Vanilin | 0,04 ± 0,02 a | 0,03 ± 0,01 a | 0,03 ± 0,01 a |

¹Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri postupka pripreme infuzija × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima u istom retku ukazuju na statistički značajnu razliku između temperatura pripreme (Tukeyev test, $p < 0,05$).

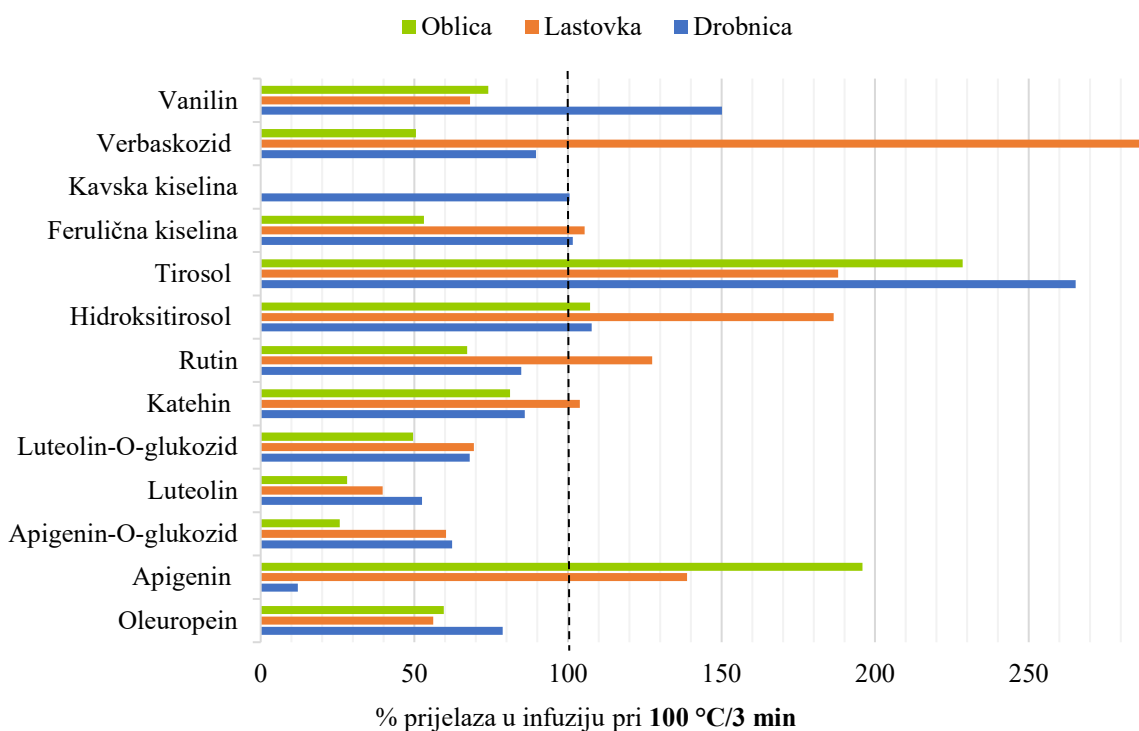
²n.d. – nije detektirano



Slika 6. Prijelaz pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica u vodene infuzije pripremljene na 25 °C/30 minuta u odnosu na ekstrakciju metanolom.



Slika 7. Prijelaz pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica u vodene infuzije pripremljene na 75 °C/3 minute u odnosu na ekstrakciju metanolom.



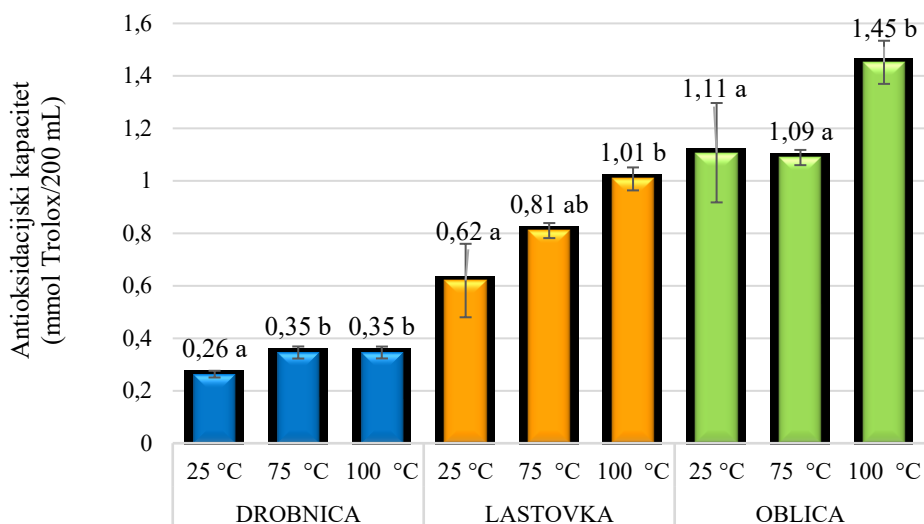
Slika 8. Prijelaz pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica u vodene infuzije pripravljene na 100 °C/3 minute u odnosu na ekstrakciju metanolom.

Tablica 9. Masene koncentracije (mg/200 mL) hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u infuzijama sorti Drobница, Lastovka i Oblica pri različitim uvjetima pripreme.

| Sorta | Derivati hidroksitirosola (mg/200 mL) | | |
|----------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| | 25 °C/30 min | 75 °C/3 min | 100 °C/3 min |
| Drobница | 28,56 | 44,97 | 56,90 |
| Lastovka | 21,48 | 34,59 | 44,31 |
| Oblica | 31,18 | 54,29 | 57,70 |

4.4. Utjecaj temperature pripreme na antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice

Na Slici 9 prikazan je utjecaj temperature pripreme na antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća sorti Drobnice, Lastovke i Oblice.



Slika 9. Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox/200 mL) infuzija od lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica. Infuzije su pripremane na 25 °C/30 minuta, 75 °C/3 minute i na 100 °C/3 minute. Rezultati su srednje vrijednosti tri određivanja (tri postupka pripreme infuzija × jedno analitičko određivanje) ± standardna devijacija. Srednje vrijednosti označene različitim malim slovima unutar iste sorte ukazuju na statistički značajnu razliku između temperatura pripreme (Tukeyev test, $p < 0,05$).

4.5. Korelacijski odnosi

U Tablici 9. prikazani su Pearsonovi koeficijenti korelacije između pojedinih fenolnih tvari analiziranih u vodenim infuzijama, temperature pripreme infuzija, antioksidacijskog kapaciteta te fizikalno-kemijskih svojstava infuzija.

Tablica 10. Koeficijenti korelacije između pojedinih fenolnih tvari u infuzijama, temperature pripreme, antioksidacijskog kapaciteta i fizikalno-kemijskih svojstava infuzija.

| | Pearsonov koeficijent korelacije | | | | |
|---|----------------------------------|---|-----------------------------|--------------|----------------------------|
| | temp. pripreme (°C) | antioks. kapacitet (mmol Trolox/200 mL) | el.pr. ¹ (μS/cm) | pH | udio s.t. ² (%) |
| Oleuropein | 0,83 ³ | 0,31 | 0,00 | -1,18 | 0,65 |
| Apigenin | 0,35 | 0,49 | 0,75 | -0,28 | -0,52 |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid | 0,73 | -0,26 | -0,09 | 0,64 | 0,38 |
| Luteolin | 0,61 | -0,24 | 0,01 | -0,77 | 0,65 |
| Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid | 0,91 | 0,54 | 0,52 | -0,33 | 0,19 |
| Katehin | -0,00 | 0,88 | 0,82 | 0,46 | -0,24 |
| Rutin | 0,48 | -0,68 | -0,58 | -0,70 | 0,58 |
| Hidroksitirozol | 0,69 | 0,11 | 0,53 | -0,72 | -0,15 |
| Tirosol | 0,69 | 0,18 | 0,36 | -0,57 | -0,09 |
| Ferulična kiselina | 0,17 | -0,07 | 0,51 | -0,55 | -0,50 |
| Kavska kiselina | 0,70 | 0,89 | -0,77 | -0,56 | 0,19 |
| Verbaskozid | 0,44 | 0,15 | 0,69 | -0,71 | -0,22 |
| Vanilin | -0,33 | 0,38 | -0,03 | 0,81 | 0,19 |
| temp. pripreme (°C) | 1,00 | | | | |
| antioks. kapacitet (mmol Trolox/200 mL) | 0,27 | 1,00 | | | |
| el. pr. (μS/cm) | 0,25 | 0,75 | 1,00 | | |
| pH | -0,57 | 0,42 | 0,07 | 1,00 | |
| udio s.t. (%) | 0,42 | -0,19 | -0,36 | -0,33 | 1,00 |

¹ el. pr. – električna provodljivost

² udio s. t. – udio suhe tvari

³ koeficijenti korelacije otisnuti masnim slovima statistički su značajni ($p < 0,05$)

5. RASPRAVA

U ovom radu istražen je fenolni sastav maslinovog lišća autohtonih sorti (Drobnice, Lastovke i Oblice) te njihovih vodenih infuzija pripremanih hladnim i toplim postupkom. Hladni postupak podrazumijeva pripremu infuzija na sobnoj temperaturi uz duže vrijeme (do 120 minuta) namakanja biljnog materijala (Pastoriza, et al., 2017), a istražen je budući da su dosadašnja istraživanja pokazala da se hladnom pripremom zelenog i bijelog čaja dobiva napitak manje gorčine i oporosti te intenzivnijih mirisnih svojstava (Castiglioni, et al., 2015). Lišće svih triju sorti korišteno u istraživanju ubrano je u istom ekološkom masliniku da bi se izbjegao utjecaj zemljopisnog područja uzgoja, pedoklimatskih uvjeta i primijenjenih agrotehničkih mjera na varijabilnost rezultata. S obzirom na karakteristike odabranih sorti prikazane u Tablici 1, mogu se očekivati razlike u fenolnom sastavu lišća i njihovim infuzijama. Osim fenolnog sastava, pripremljenim infuzijama određena je pH vrijednost, električna provodljivost, udio topljive suhe tvari te antioksidacijski kapacitet.

5.1. Fenolni sastav maslinovog lišća

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je genotip tj. sorta ključan čimbenik koji utječe na fenolni profil maslinovog lišća (Di Donna, et al., 2010; Ranalli, et al., 2006) te se maseni udio pojedinih fenolnih tvari može koristiti kao kemo-taksonomski marker za diskriminaciju sorti kultiviranih na istom zemljopisnom području (Talhaoui, et al., 2015). Maseni udjeli fenolnih tvari u lišću sorti Drobnica, Lastovka i Oblice prikazani su u Tablici 4, a podijeljeni su u skupine sukladno podjeli prikazanoj na Slici 2 (sekoiridoidi, flavonoidi, fenolni alkoholi, kiseline i njihovi derivati). Od identificiranih fenolnih spojeva u lišću sve tri sorte najzastupljeniji je oleuropein (89 % od ukupnih identificiranih fenola kod Drobnice te 90 % kod Lastovke i Oblice). Lišće Oblice sadržavalo je statistički značajno veći maseni udio

oleuropeina (95,44 mg/g s.t. lišća) u odnosu na lišće Drobnice i Lastovke koje su imale 70,58 mg oleuropeina/g odnosno 74,24 mg/g s.t. lišća. Nedavno istraživanje Ben Mohameda i sur. (2018) pokazalo je da oleuropein prevladava u fenolnom sastavu lišća kod 21 sorte maslina s jugoistoka Tunisa te navode da maseni udio oleuropeina u maslinovom lišću može biti do 9 % suhe mase. Udio oleuropeina u lišću Oblice bio je nešto viši (9,5 %). Visoki udio oleuropeina kod istraživanih sorti bi mogao biti posljedica smještaja maslinika na izrazito osunčanom položaju. Izloženost sunčevoj svjetlosti, posebice UV-B zračenju može inducirati sintezu fenolnih tvari (Talhaoui, et al., 2015). Heimler i sur. dokazali su da lišće maslina koje su rasle na otvorenom i sunčanom položaju sadrži više oleuropeina i flavonoida u odnosu na lišće biljaka koje su u stakleniku bile zaštićene od sunčevog zračenja (Heimler, et al., 2002).

Nakon oleuropeina, najzastupljeniji fenolni spojevi u lišću autohtonih sorti bili su flavonoidi (od 8,5 – 8,8 % od ukupno identificiranih fenola). Od flavonoida, najzastupljeniji je bio luteolin-7-*O*-glukozid. Njegov udio statistički je značajno bio viši u lišću Oblice (7,11 mg/g) u odnosu na Lastovku (5,84 mg/g) i Drobnicu (4,66 mg/g). Ovi rezultati u skladu su s rezultatima Pereire i sur. koji su utvrdili da su oleuropein i luteolin-7-*O*-glukozid najzastupljeniji fenolni spojevi u liofiliziranom ekstraktu lista masline (Pereira, et al., 2007). Od ostalih spojeva iz skupine flavonoida, lišće Drobnice, Lastovke i Oblice statistički se značajno razlikuju s obzirom na maseni udio luteolina i rutina. Iako je Oblica imala najviši udio luteolin-7-*O*-glukozida, udio luteolina bio je najniži kod ove sorte (0,15 mg/g s.t.). Maseni udio rutina kretao se od 0,58 mg/g s.t. lišća kod Lastovke do 1,24 mg/g s.t. kod Drobnice.

Kod istraživanih sorti udio fenolnih alkohola (hidroksitirosola i tirosola) bio je od 0,4 % (kod Oblice) do 0,6 % (kod Drobnice) od ukupno identificiranih fenola. Hidroksitirosol je fenolni alkohol snažne antioksidacijske aktivnosti te se nalazi u strukturi oleuropeina te značajno doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti oleuropeina (Talhaoui, et al., 2015). Lišće Drobnice sadržavalo je najveći maseni udio hidroksitirosola (0,41 mg/g s.t) u usporedbi s

Lastovnom i Oblicom. Maseni udio tirosola bio je manji od udjela hidroksitirosola kod sve tri sorte (0,04 – 0,08 mg/g s.t.).

Karakteristično za sve tri istraživane sorte je da su sadržavale vrlo nizak udio fenolnih kiselina (ferulične i kavske kiseline). Verbaskozid je složeni fenolni glukozid koji je prisutan u lišću maslina, a sastoji se od kavske kiseline i hidroksitirosola vezanih esterskom odnosno eterskom vezom na ramnozu. Udio verbaskozida statistički se značajno razlikovao kod istraživanih autohtonih sorti a kretao se od 0,69 mg/g s.t. (Lastovka) do 0,99 mg/g s.t. (Drobnica).

5.2. Utjecaj temperature pripreme na fizikalno-kemijska svojstva infuzija maslinovog lišća

Od fizikalno-kemijskih svojstava infuzija maslinovog lišća određivani su: udio topljive suhe tvari, pH vrijednost i električna provodljivost (Tablica 5). Suhu tvar vodenih infuzija čine sve tvari koje su topljive u vodi i koje prilikom pripreme prelaze u vodenu otopinu. U slučaju pripreme infuzija od maslinovog lišća osim fenolnih tvari, u vodenu otopinu mogu prijeći i šećeri (glukoza, manitol), mineralne tvari i pigmenti zastupljeni u listu (Souilem, et al., 2017). Udio suhe tvari u infuzijama se kretao u rasponu od 0,09 % (kod hladne pripreme kod Lastovke) do 0,19 % (kod pripreme na 100 °C kod Drobnice). Povišenje temperature pripreme nije značajno utjecao na udio suhe tvari u infuzijama.

Infuzije od maslinovog lišća dobivene hladnim postupkom imale su pH vrijednost od 5,51 – 5,70, a povišenjem temperature pripreme na 75 i 100 °C došlo je do malog, ali statistički značajnog pada pH vrijednosti. Smanjenje pH vrijednosti moguća je posljedica povišenog prijelaza tirosola i verbaskozida u vodene infuzije prilikom tople pripreme (slika 7 i 8) koji u vodenim otopinama imaju kiselna svojstva (Anon., 2019). Vrijednosti pH infuzija bile su u

negativnom korelacijskom odnosu s temperaturom pripreme te u statistički značajnom negativnom korelacijskom odnosu s masenim koncentracijama luteolina, rutina i hidroksitirosola (Tablica 10).

Električna provodljivost vodenih infuzija ovisi o prisutnosti otopljenih mineralnih tvari koje potječu iz samog lista. Najzastupljenije mineralne tvari u listu su cink, mangan, željezo, bakar, magnezij i kalij (Kailis & Harris, 2007). Temperatura pripreme nije značajno utjecala na električnu provodljivost infuzija od lišća Drobnice i Oblice, a u slučaju Lastovke kod pripreme na 100 °C je došlo do blagog, ali statistički značajnog povišenja električne provodljivosti (s 167,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ kod hladne pripreme na 189,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Električna provodljivost infuzija je bila u blagom pozitivnom korelacijskom odnosu s temperaturom pripreme (Tablica 10).

5.3. Utjecaj temperature pripreme na sastav fenola u infuzijama maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice

Predmet mnogih istraživanja je utjecaj uvjeta pripreme na bioaktivni profil čajeva i biljnih infuzija (Pastoriza i sur., 2017). Prijelaz brojnih bioaktivnih tvari u vodene otopine ovisi o uvjetima pripreme, poput vremena i temperature pripreme, broju ekstrakcija itd. Uobičajena priprema zelenog čaja je na temperaturi 80-90 °C u trajanju 3-4 minute, dok je pri temperaturi od 60 °C preporučena priprema kroz 5 minuta (Cabrera & Giménez, 2010). Casazza i sur. (2017) utvrdili su da uz način pripreme napitka od maslinovog lišća (infuzijski ili dekokcijski), temperatura sušenja maslinovog lišća (70 °C, u struji dušika) i veća usitnjenosti lišća značajno utječu na sastav fenola i povećavaju njihov udio u dobivenim napitcima (Casazza, et al., 2017). Uvjeti pripreme infuzija prilagođavaju se tako da bi napitci imali što bolja senzorska svojstva. Budući da je istraživanje (Europska Komisija, 2012)Medine i sur. (2019) pokazalo da se gotovo ¼ netreniranih senzorskih ocjenjivača izjasnila da ne bi konzumirali napitak od usitnjenog

maslinovog lišća (srednji stupanj usitnjenosti, vrijeme pripreme napitka 5 minuta) zbog izražene gorčine, u ovom istraživanju topla priprema provedena je u kraćem vremenu (3 minute) da bi se dobio napitak prihvatljiviji za konzumaciju. Iz istog razloga je odabrano kraće vrijeme (30 minuta) kod hladne pripreme u odnosu na uobičajenih dva sata (Medina , et al., 2019).

U infuzijama od lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica povećanje temperature pripreme statistički je značajno povećalo masene koncentracije većine pojedinačnih fenola, izuzev apigenina, fenolnih kiselina i vanilina (Tablice 6, 7 i 8). Masene koncentracije oleuropeina i luteolin-7-*O*-glukozida bile su u visokoj i statistički značajnoj korelacijom s temperaturom pripreme infuzija (Tablica 10).

Infuzije sorte Drobница (Tablica 6) sadržavale su 90 % oleuropeina od ukupno identificiranih fenola kod svih uvjeta pripreme. Kod pripreme na 100 °C infuzije sadrže gotovo dvostruko više oleuropeina (55,57 mg/200 mL) u odnosu na pripremu pri 25 °C (28,24 mg/200 mL), a razlike između temperatura pripreme statistički su značajne. Od zastupljenijih fenolnih tvari u lišću, masene koncentracije luteolin-7-*O*-glukozida i verbaskozida također su se statistički značajno povećale s temperaturom pripreme. Za razliku od ostalih sorti, kod infuzija sorte Drobница nije došlo do statistički značajnih promjena masenih koncentracija katehina i tirosola s temperaturom pripreme. Podaci o prijelazu fenolnih tvari iz lišća u infuzije (Slike 6, 7 i 8) predstavljaju učinkovitost vodene ekstrakcije u odnosu na ekstrakciju metanolom. Najveće povećanje učinkovitosti ekstrakcije tirosola ostvareno je u infuzijama Drobnice (za više od 200 % kod hladne i toplih priprema na 75 i 100 °C u odnosu na ekstrakciju metanolom). Kod drugih sorti učinkovitost ekstrakcije tirosola vodom bila je za 100 % veća od ekstrakcije metanola, uz nešto veću učinkovitost kod Oblice u usporedbi s Lastovkom.

Iako je lišće Lastovke i Oblice imalo veći udio oleuropeina od lišća Drobnice (Tablica 4) prijelaz oleuropeina u infuzije od sorte Lastovka i Oblica bio je manje učinkovit u usporedbi

s Drobnicom osobito kod toplih priprema (Slika 7 i 8). Konzumacijom jedne šalice infuzije od Lastovke pripremljene na 100 °C unese se manje oleuropeina (41,68 mg/200 mL) nego jednom šalicom infuzije od Drobnice i Oblice pripremljenih na isti način (55,57 – 56,92 mg/200 mL) (Tablice 6, 7 i 8). U infuzije od Lastovke došlo je do znatno boljeg prijelaza verbaskozida i hidroksitirosola kod svih načina priprema u odnosu na druge dvije sorte, osobito kod pripreme na 75 i 100 °C.

Za infuzije od sorte Oblica (Tablica 8) karakteristično je da nije došlo do prijelaza fenolnih kiselina kod svih načina pripreme te verbaskozida kod hladne pripreme. Kao i kod ostalih sorti, najviše fenolnih tvari u šalici napitka dobiva se toplom pripremom (na 100 °C) osobito onih koji su i najzastupljeniji u listu (oleuropein, luteolin-7-O-glukozid, rutin i verbaskozid).

U Tablici 9 prikazane su sumirane masene koncentracije hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u jednoj šalici infuzije (200 mL). Za djevičanska maslinova ulja odobrena je zdravstvena tvrdnja „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidacijskog stresa“ pri čemu ulja moraju sadržavati minimalno 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata u 20 g (EU 432/2012), uz napomenu da se povoljan učinak postiže dnevnim unosom te količine ulja. Konzumiranjem jedne šalice infuzija od lišća triju autohtonih sorti uključenih u ovo istraživanje unese se od četiri puta više derivata hidroksitirosola (hladna priprema Lastovke) do gotovo 12 puta više (Oblica, na 100 °C) u odnosu na minimalno 5 mg iz odobrene zdravstvene tvrdnje za djevičanska maslinova ulja. S obzirom na to, maslinovo lišće namijenjeno pripremi infuzija moglo bi se razmotriti za odobravanje i isticanje slične zdravstvene tvrdnje.

5.4. Utjecaj temperature pripreme na antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice

Antioksidansi ili inhibitori oksidacije su spojevi koji usporavaju ili sprečavaju oksidaciju djelujući na slobodne radikale koji imaju štetno djelovanje na organizam (Chirag, et al., 2013). Charig i sur. analizirali su njihovu ulogu u ljudskom tijelu, kao i njihovoj prisutnosti u začinima i drugom bilju (Chirag, et al., 2013). Antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija, osim o biljnoj vrsti i sadržaju ukupnih fenola, ovisi i o vremenu i uvjetima čuvanja biljnog materijala (Jiménez-Zamora, et al., 2016).

Povišenje temperature pripreme statistički je značajno povećao antioksidacijski kapacitet infuzija osobito kod Lastovke i Oblice (Slika 9). S obzirom na to da su infuzije od sorte Oblica imale najveći udio hidroksitirosoila i njegovih derivata (fenolnih tvari snažnog antioksidacijskog djelovanja, Tablica 9) očekivano su imale i najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (od 1,11 do 1,45 mmol Troloxa/200 mL). Uzimajući u obzir sve sorte, antioksidacijski kapacitet infuzija je u visokoj i statistički značajnoj korelaciji s masenom koncentracijom katehina (Tablica 10).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave, zaključci ovoga rada su sljedeći:

- 1.) U lišću autohtonih sorti najzastupljenije fenolne tvari su oleuropein, luteolin-7-*O*-glukozid i rutin. Lišće Oblice sadrži statistički značajno veći maseni udio oleuropeina (95,44 mg/g s.t.) od Drobnice (70,58 mg/g s.t.) i Lastovke (74,24 mg/g s.t.).
- 2.) Lišće sorti Drobница, Lastovka i Oblica značajno se razlikuje u sastavu fenola, osobito s obzirom na maseni udio luteolina, luteolin-7-*O*-glukozida, rutina i verbaskozida.
- 3.) Povećanje temperature pripreme s 25 °C na 100 °C ne utječe na udio suhe tvari infuzija, blago, ali statistički značajno smanjuje pH vrijednost te povisuje električnu provodljivost samo infuzija Lastovke.
- 4.) Viša temperatura pripreme infuzija lišća statistički značajno povećava masene koncentracije većine fenolnih tvari, izuzev apigenina, fenolnih kiselina i vanilina.
- 5.) Vodenom ekstrakcijom ostvaruje se vrlo visok prijelaz tirosola, osobito kod infuzija Drobnice pri hladnoj i toploj pripremi, te verbaskozida i hidroksitirosola u infuzije Lastovke kod pripreme na 100 °C/3 min.
- 6.) Priprema na 100 °C povisuje antioksidacijski kapacitet infuzija sve tri sorte u odnosu na 25 °C/30 min., što ukazuje na bolju topljivost fenola pri višim temperaturama.
- 7.) Konzumacijom samo jedne šalice (200 mL) infuzija od lišća autohtonih sorti unese se visoka doza fenolnih tvari, osobito oleuropeina, verbaskozida i hidroksitirosola (od 28,56 mg kod hladne pripreme Drobnice do 57,70 mg kod Oblice pripremljene na 100 °C).

Priprema infuzija od usitnjenog maslinovog lišća autohtonih sorti hladim ili toplim postupkom predstavlja jednostavan način dobivanja napitka bogatog antioksidansima.

7. LITERATURA

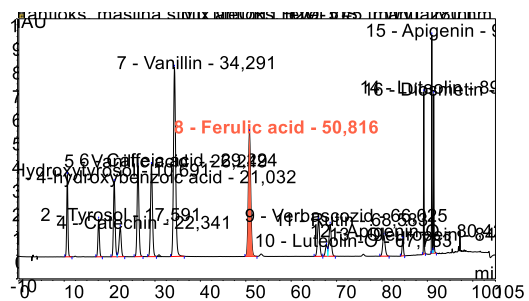
- 1) Abera, T., 2018. *Can i use Trolox as a standard for DPPH assay?*
- 2) Anon., 2019. *Food Componente Database*.
Dostupno na: <http://foodb.ca/>
- 3) Basuny, A. M. & Arafar, S. M., 2018. Olive Leaves Healthy Alternative for Green Tea. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 14(3).
- 4) Benavente-Garcia, O. i dr., 2000. Antioxidant activity of phenolics from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), pp. 457-462.
- 5) Bendini, A. i dr., 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade.. *Molecules*, 12(8), pp. 1679-1719.
- 6) Berkem, 2018. *Berkem*.
Dostupno na: <http://www.berkem.com/en/expertise-en/plant-extraction>
- 7) Boudhrioua, N., BahloulImen, N., Slimen, B. & Kechaou, N., 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), pp. 412-419.
- 8) Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Tehnology*, 28(1), pp. 25-30.
- 9) Braun, L. & Cohen, M., 2015. *Herbs & Natural Supplements, Volume 2: An Evidence-Based Guide*. 4. ur. s.l.:Churcill Livingstone Australia.
- 10) Bulimbašić, S., 2011. *Sorte maslina u Hrvatskoj*. Split: Agroknjiga p.n.z..
- 11) Bullota, S. i dr., 2014. Beneficial effects of the olive oil components oleuropein and hydroxytyrosol: focus against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translation Medicine* , 12(1), pp. 219-228.
- 12) Cabrera, C. & Giménez, R., 2010. Café,té, cacao y productos derivados. U: G. a. Panamericana, ur. *Tratado de nutricion*. s.l.:an.

- 13) Casazza, A. i dr., 2017. Olive Leaves Infuse and Decoct Production: Influence of Leaves Drying Conditions and Particle Size. *Chemical Engineering Transactions*, Svezak 57.
- 14) Castiglioni, S., Damiani, E., Astolfi, P. & Carloni, P., 2015. Influence of steeping conditions (time, temperature, and particle size) on antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(5), pp. 491-497.
- 15) Chirag, P. J. i dr., 2013. Antioxidant Activity of Herbal Plants: a recent Review. *Journal of Drug Discovery And Therapeutics*, 1(8).
- 16) Di Donna, L. i dr., 2010. Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis. *Food Chemistry*, 121(2), pp. 492-496.
- 17) Europska Komisija, Uredba komisije Europske Unije 432/2012 o utvrđivanju popisa dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece. *Službeni List Europske unije*, 16. svibnja 2012.
- 18) Guinda, A., 2006. Use of solid residue from olive industry. *Grasas y Aceites*, 57(1), pp. 107-115.
- 19) Heimler, D. i dr., 2002. Flavonoids from olive leaves (*Olea europaea* L.) as affected by light. *Journal Commodity Science*, Svezak 41, pp. 31-39.
- 20) Jakelić, M. i dr., 2016. *Odnosi suhe tvari ekstraktata ljekovitog bilja, električne vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari*, Zagreb: PBF Zagreb.
- 21) Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C. & Rufián-Henares, J. A., 2016. Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusions. *Food Chemistry*, Svezak 199, pp. 339-346.
- 22) Kailis, S. & Harris, D., 2007. *Producing Table Olives*. s.l.:Landlinks Press.
- 23) Kovačić, I., Bilić, J., Dudaš, S. & Poljuha, D., 2017. Sadržaj fenola i antioksidacijski kapacitet u infuzijama listova istarskih sorata maslina. *Poljoprivreda*, 23(2), pp. 38-45.
- 24) Mansoor, A., 2002. Liquid chromatography. *Encyclopedia of Life science*, pp. 1-3.

- 25) Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical technology and Metallurgy*, 40(3), pp. 255-260.
- 26) Maslinar, 2018. *Maslinar*.
Dostupno na: <https://www.maslinar.com/u-najnovijem-popisu-26-sorti-maslina/>
- 27) Medina , E., Romero, C. & García , P., 2019. Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food & Function*, Svezak 10, pp. 4716-4724.
- 28) Miličić, S., 2016. *Botanički vrh*.
Dostupno na: <http://botanickivrh.hr/>
- 29) Mohamed, M. B. i dr., 2018. The LC-MS/MS characterization of phenolic compounds in leaves allows classifying olive cultivars grown in South Tunisia. *Biochemical Systematics and Ecology*, Svezak 78, pp. 84-90.
- 30) Pastoriza, S., Pérez-Burillo, S. & Rufián-Henares, J. Á., 2017. How brewing parameters affect the healthy profile of tea. *Current Opinion in Food Science*, Svezak 14, pp. 7-12.
- 31) Pereira, A. P. i dr., 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) leaves. *Molecules*, Svezak 12, pp. 1153-1162.
- 32) Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53(10), pp. 4290-4302.
- 33) Ranalli, A. i dr., 2006. Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), pp. 434-400.
- 34) Sahin, S. & Bilgin, M., 2017. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and oil industry. *Journal of the science of food and agriculture*.
- 35) Savarese, M., De Marco , E. & Sacchi, R., 2007. Characterization of phenolic extracts feom olives (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105(2), pp. 761-770.

- 36) Sawe, B. E., 2017. *Worldatlas*.
Dostupno na: <https://www.worldatlas.com/articles/leading-olive-producing-countries.html>
- 37) Shahbandeh, M., 2018. *Statista*.
Dostupno na: <https://www.statista.com/statistics/937256/share-of-table-olive-production-by-country-global/>
- 38) Souilem, S. i dr., 2017. Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries. *Food and Bioprocess Technology*, 10(2), p. 229–248.
- 39) Spencer, J. P. E., 2003. Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Nutrition*, Svezak 133, pp. 3255-3261.
- 40) Talhaoui, N., 2016. *Analytical, agronomic, and biological evaluation of phenolic compounds in Olea europaea products and by-products*. Granada, University of Granada.
- 41) Talhaoui, N. i dr., 2015. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77(2), pp. 92-108.
- 42) Ward, N. C. i dr., 2004. oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radical in Biology and Medicine*, 36(2), pp. 226-232.
- 43) *Znate li razliku između čaja i toplog napitka?*. 2018. Hrvatska Radio Televizija.

PRILOZI



Slika 10. Kromatogram standardnih fenolnih tvari korištenih za identifikaciju i kvantifikaciju (detekcija pri 280 nm)

Životopis

OSOBN INFORMACIJE

Iva Previšić

Antuna Branka Šimića 21, 32100 Vinkovci (Hrvatska)

032 304 077

099 677 2224

previsic.iva@gmail.com

17. rujna 1994., Vinkovci

OBRAZOVANJE

- 09/2001–07/2009 Osnovna škola Antuna Gustava Matoša, Vinkovci
- 09/2009–07/2013 Prirodoslovno-matematička gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci
- 07/2013–09/2017 Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet, Rijeka
- 09/2017–danas Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet, Rijeka

OSOBN VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

| Strani jezici | RAZUMIJEVANJE | | GOVOR | | PISANJE |
|---------------|---------------|---------|---------------------|--------------------|---------|
| | Slušanje | Čitanje | Govorna interakcija | Govorna produkcija | |
| engleski | B2 | B2 | B2 | B2 | B2 |
| njemački | B1 | B1 | B1 | B1 | B1 |

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2:

Iskusni korisnik

Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine timski duh, vrlo komunikativna i otvorena osoba, sposobnost prilagodbe radnom okruženju

Organizacijske / sudjelovanje u organizaciji :

- rukovoditeljske vještine
- Sanitas 2018 i 2019, član Organizacijskog odbora, urednik Knjige sažetaka,
 - NeuRi 2018 i 2019, volonter,
 - Nacionalne konferencije o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda 2018 i 2019,
 - Internacionalnog festivala Etno frizure svijeta, Etno frizure Hrvatske, Etno kreacija Hrvatske i Etno revija Vinkovačke Jeseni

Digitalne vještine

| SAMOPROCJENA | | | | |
|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Obrada informacija | Komunikacija | Stvaranje sadržaja | Sigurnost | Rješavanje problema |
| Iskusni korisnik | Iskusni korisnik | Samostalni korisnik | Temeljni korisnik | Samostalni korisnik |

Napredno korištenje programa *MS Office*-a, osnovno korištenje programa *Statistica*, osnovno korištenje programa *Sibelius*

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

- Konferencije, Kongresi, Seminari, Škole
- International Summer School FSHL – 2019*, Rumunjska 2019
 Kongres prehrane i kliničke dijetoterapije 2019, Rijeka 2019,
 Studentski kongres zaštite zdravlja - Sanitas 2019, nagrada: Najbolja poster prezentacija, Rijeka 2019,
 Dvodnevna škola Osnove znanstvenog izražavanja, Rijeka 2019,
 Seminar folkora Panonske zone, Vinkovci:
- kolegij Samica: 2007-2009
 - kolegij Tradicijska solistička glazbala: 2010
 - kolegij Tambure: 2011,2013,2015,2017 i 2019
- International Children's Folklore & Folkgame Festival*, Tajvan 2017
Festival of the children of mountains, Poljska 2016
Enfants et Danses du Monde, Festival Gauargi, Francuska 2015
Gökcan College International children's folk dance festival, Turska 2011
Municipality of Kochani, Makedonija 2009

Članstva Kulturni centar Gatalinka od 12/1999

Popis tablica

| | |
|--|----|
| Tablica 1. Prikaz karakteristika sorti Drobnice, Lastovke i Oblice..... | 3 |
| Tablica 2. Promjena sastava mobilne faze tijekom gradijentnog eluiranja. | 20 |
| Tablica 3. Valne duljine UV-VIS detekcije fenolnih spojeva. | 21 |
| Tablica 4. Maseni udjeli fenolnih tvari u lišću Drobnice, Lastovke i Oblice (mg/g s.t. lišća).25 | |
| Tablica 5. Udio suhe tvari, pH vrijednost i električna provodljivost infuzija od maslinovog lišća Drobnice, Lastovke i Oblice dobivenih hladnom i toplom pripremom. | 26 |
| Tablica 6. Masene koncentracije fenolnih tvari (mg/200 mL) u infuzijama od maslinovog lišća sorte Drobница dobivenih hladnom i toplom pripremom. | 27 |
| Tablica 7. Masene koncentracije fenolnih tvari (mg/200 mL) u infuzijama od maslinovog lišća sorte Lastovka dobivenih hladnom i toplom pripremom. | 28 |
| Tablica 8. Masene koncentracije fenolnih tvari (mg/200 mL) u infuzijama od maslinovog lišća sorte Oblica dobivenih hladnom i toplom pripremom. | 29 |
| Tablica 9. Masene koncentracije (mg/200 mL) hidroksitirosole i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u infuzijama sorti Drobница, Lastovka i Oblica pri različitim uvjetima pripreme. | 31 |
| Tablica 10. Koeficijenti korelacije između pojedinih fenolnih tvari u infuzijama, temperature pripreme, antioksidacijskog kapaciteta i fizikalno-kemijskih svojstava infuzija..... | 33 |

Popis slika

| | |
|--|----|
| Slika 1. Sastav i podjela maslinovog lišća po biološkim komponentama. | 4 |
| Slika 2. Fenolni spojevi sadržani u maslinovom lišću sorti Drobница, Lastovka i Oblica. | 5 |
| Slika 3. Prikaz osušenog lišća sorti a) Drobница b) Lastovka i c) Oblica..... | 14 |
| Slika 4. Primjer osušenog i usitnjenog lišća sorti a) Drobница b) Lastovka i c) Oblica | 19 |
| Slika 5. Kalibracijski pravac za izračun antioksidacijskog kapaciteta infuzija. | 23 |
| Slika 6. Prijelaz pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica u vodene infuzije pripremljene na 25 °C/30 minuta u odnosu na ekstrakciju metanolom..... | 30 |
| Slika 7. Prijelaz pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica u vodene infuzije pripremljene na 75 °C/3 minute u odnosu na ekstrakciju metanolom..... | 30 |
| Slika 8. Prijelaz pojedinih fenolnih tvari iz maslinovog lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica u vodene infuzije pripremljene na 100 °C/3 minute u odnosu na ekstrakciju metanolom..... | 31 |
| Slika 9. Antioksidacijski kapacitet (mmol Trolox/200 mL) infuzija od lišća sorti Drobница, Lastovka i Oblica | 32 |
| Slika 10. Kromatogram standardnih fenolnih tvari korištenih za identifikaciju i kvantifikaciju (detekcija pri 280 nm) | 47 |
| Slika 11. Preklopljeni kromatogrami lišća sorte Oblica fenolnog ekstrakta u metanolu i infuzija pripremanih na 25 °C, 75 °C i 100 °C (detekcija pri 280 nm)..... | 48 |