

Polifenoli i minerali u infuzijama listova masline - utjecaj vremena čuvanja listova

Tokić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:184:200085>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Tokić

**POLIFENOLI I MINERALI U INFUZIJAMA LISTOVA MASLINE – UTJECAJ
VREMENA ČUVANJA LISTOVA**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Tokić

**POLIFENOLI I MINERALI U INFUZIJAMA LISTOVA MASLINE – UTJECAJ
VREMENA ČUVANJA LISTOVA**

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.

Diplomski rad obranjen je 25. rujna 2020. na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred

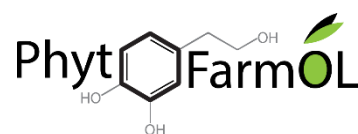
Povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Sandra Pavičić-Žeželj (predsjednica povjerenstva)
2. doc. dr. sc. Valerija Majetić Germek, dipl. sanit. ing.
3. prof. dr. sc. Olivera Koprivnjak, dipl. ing. preh. teh.

Rad ima 43 stranice, 2 slike, 10 tablica i 38 literaturnih 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.

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



ZAHVALE

Prije svega zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Oliveri Koprivnjak, dipl.ing. preh. teh. i dr. sc. Pauli Žurga, dipl. ing. bioteh. s Odsjeka za zajedničke analitičke tehnike Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ, za savjete, pomoć, strpljenje i podršku. Također zahvaljujem doc. dr. sc. Valeriji Majetić Germek, dipl. sanit. ing. jer me uključila u istraživanje na osnovu kojeg je nastao ovaj rad. Zatim, zahvaljujem i Bojani Lukić, mag. sanit. ing. na pomoći u eksperimentalnom radu i praktičnim savjetima. Hvala Šimi Marceliću, mag. ing. agr. što je uzorkovao maslinovo lišće i osigurao nam dovoljne količine za provođenje istraživanja.

Zahvaljujem se svojim roditeljima na podršci, razumijevanju i upućivanju na pravi put, braći i sestri na ohrabrenju i poticanju te svojim prijateljima jer su pripomogli da ovaj tijek studiranja bude lak i zabavan!

Polifenoli i minerali u infuzijama listova masline – utjecaj vremena čuvanja listova

Sažetak

U ovom su radu istraživani neki aspekti pripremanja biljnih infuzija od lista masline sorte Leccino korisni u praktičnoj primjeni, kao što su utjecaj stupnja usitnjenosti lišća te vremena i oblika čuvanja lišća na prelazak fenolnih i mineralnih tvari u vruću vodenu otopinu. Fenolne tvari određivane su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC), a mineralni je sastav određivan induktivno spregnutim plazma masenim spektrometrom. Rezultati rada pokazali su da vanilinska kiselina i diosmetin nisu detektirani ni u jednoj od provedenih analiza. Ekstrakcija fenolnih tvari metanolom kod netom osušenih listova učinkovitija je od ekstrakcije vrućom vodom za oko 33%. Ekstrakcija vrućom vodom iz netom osušenih mljevenih listova je oko 4 puta učinkovitija u odnosu na rezani oblik, ali nakon dvomjesečnog čuvanja između rezanog i cjelovitog oblika lista nema značajnih razlika. Uslijed dvomjesečnog čuvanja osušenih listova masa fenolnih tvari ekstrahiranih vrućom vodom smanjila se za oko 6% u odnosu na početne razine. Konzumiranjem jedne šalice infuzije pripremljene s 200 mL vruće vode i 2 do 4 g osušenog, različito usitnjenog i do dva mjeseca čuvanog lista masline sorte Leccino moguće je unijeti 10 do 20 puta više bioaktivnih fenola od minimuma (5 mg) za koji je kod djevičanskih maslinovih ulja odobrena zdravstvena tvrdnja o doprinosu zaštiti lipida u krvi od oksidacijskog stresa. Jedna šalice infuzije uglavnom sadrži manje od 1% preporučenog dnevnog unosa željeza, cinka i selenija te ne predstavlja značajan prehrambeni izvor ovih elemenata.

Ključne riječi: fenoli, listovi maslina, infuzije, minerali

Polyphenols and minerals in infusions of olive leaves - influence of leaves storage times

Summary

In this paper, some aspects of preparation of herbal infusions from olive leaves of Leccino variety useful in practical application are investigated, like the influence of the degree of leaf fragmentation and time and form of leaf storage on the transition of phenolic and mineral substances into hot aqueous solution. Phenolic substances were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the mineral composition was determined by inductively coupled plasma mass spectrometer. The results showed that vanillic acid and diosmetin were undetected in any of the performed analyses. The extraction of phenolic substances with methanol in freshly dried leaves is about 33% more efficient than hot water extraction. Hot water extraction from freshly dried ground leaves is about four times more efficient compared to the cut form, but after two months of storage, there are no significant differences between the cut and whole leaf shape. Due to two months of dried leaves storage, the mass of phenolic substances extracted with hot water decreased by about 6% compared to the initial levels. By consuming one cup of infusion prepared with 200 mL of hot water and 2 to 4 g of dried olive leaves of the Leccino variety, variously chopped and stored for up to two months, it is possible to ingest 10 to 20 times more bioactive phenols than the minimum (5 mg) specified for virgin olive oils approved health claim related to the oxidative stress protection of blood lipids. One cup of infusion generally contains less than 1% of the recommended daily intake of iron, zinc, and selenium and is not a significant dietary source of these elements.

Keywords: phenols, olive leaves, infusions, minerals

SADRŽAJ:

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Maslina	2
1.1.1. Sorta maslina Leccino	2
1.1.2. Listovi maslina	3
1.2. Fenolne tvari	3
1.2.1. Fenoli u listovima masline	5
1.2.2. Fenoli u biljnim infuzijama	5
1.3. Minerali	6
1.3.1. Željezo (Fe)	7
1.3.2. Cink (Zn)	7
1.3.3. Selenij (Se)	8
1.3.4. Minerali u biljnim infuzijama	8
1.4. Zdravstveni učinci polifenola i minerala u biljnim infuzijama	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Uzorci listova masline	12
3.1.2. Standardi i kemikalije.....	12
3.1.3. Uređaji i pribor	13
3.2. Metode rada	15
3.2.1. Određivanje oblika, dužine i širine listova.....	15

3.2.2.	Sušenje i određivanje udjela suhe tvari u listovima masline.....	15
3.2.3.	Priprema listova masline za analiziranje	15
3.2.4.	Ekstrakcija fenolnih tvari iz listova masline	16
3.2.5.	Priprema vodenih infuzija listova masline	16
3.2.6.	Priprema ekstrakta fenolnih tvari i vodenih infuzija za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	17
3.2.7.	Određivanje sastava fenolnih tvari tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	17
3.2.8.	Određivanje mineralnih tvari induktivno spojenim plazma masenim spektrometrom	19
3.2.9.	Statistička obrada rezultata.....	19
4.	REZULTATI.....	20
4.1.	Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vrsti otapala za ekstrakciju ..	20
4.2.	Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o stupnju usitnjenosti lista prilikom ekstrakcije	21
4.3.	Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vremenu čuvanja listova prije ekstrakcije.....	22
4.4.	Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisi o obliku čuvanja listova prije ekstrakcije.....	24
4.5.	Nutritivne karakteristike vodenih infuzija maslinovog lišća sorte Leccino	26
5.	RASPRAVA.....	28
5.1.	Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vrsti otapala za ekstrakciju ..	28

5.2. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o stupnju usitnjenosti lista prilikom ekstrakcije	29
5.3. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vremenu čuvanja listova prije ekstrakcije	30
5.4. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisi o obliku čuvanja listova prije ekstrakcije	32
5.5. Nutritivne karakteristike vodenih infuzija maslinovog lišća sorte Leccino	33
6. ZAKLJUČCI.....	35
7. LITERATURA.....	36
Životopis.....	41
Popis tablica.....	42
Popis slika.....	43

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Maslina je funkcionalna biljka u poljoprivrednom sustavu mnogih zemalja i tijekom stoljeća je stekla ogroman društveno-ekonomski značaj. Zbog svoje dugovječnosti i prilagodljivosti igra veliku ulogu u stvaranju krajolika jer uspijeva i u otežanim klimatskim uvjetima te siromašnim tlima (Cimato & Attilio, 2011). Na svijetu je zasađeno više od osam milijuna hektara stabala maslina, a 98% nalazi se u mediteranskom dijelu. To nam govori da masline čine jednu od najvažnijih poljoprivrednih kultura mediteranskih zemalja (Basuny & Arafat, 2018.). Prema statističkim podacima u Republici Hrvatskoj došlo je do povećane proizvodnje maslina u 2019. godini u odnosu na prethodne godine (Državni zavod za statistiku, 2020.).

Osim tradicionalnih otpadnih materijala pri proizvodnji maslinovih ulja, vegetabilne vode i komine maslina, listovi maslina također se smatraju nusproizvodima i danas se spaljuju ili koriste kao hrana za životinje iako sadrže velike količine bioaktivnih spojeva (Casazza, *et al.*, 2017). Maslinovo lišće još nije dovoljno iskorišteno u medicinskim primjenama kao izvor korisnih fenola. Iskorištavanjem maslinovih listova kao polazne sirovine u proizvodnji funkcionalne hrane ili drugih medicinskih proizvoda može se poboljšati gospodarenje biološkim otpadom (Peršurić, *et al.*, 2018.).

Biljni materijali izuzetno su složeni matriksi. Klasični postupci ekstrakcije bioaktivnih tvari iz njih uključuju upotrebu otapala, stoga se razvijaju ekološki prihvatljivije metode ekstrakcije kojima se dobivaju ekstrakti prikladni za uporabu u kozmetičkim i prehrambenim proizvodima. Listovi masline od posebnog su značaja jer imaju više različitih zdravstvenih učinaka.

U ovom su radu razmotreni neki aspekti pripremanja infuzija od lista masline korisne u praktičnoj primjeni, kao što su utjecaj stupnja usitnjenosti lišća na prelazak fenolnih i mineralnih tvari u vodenu otopinu, te utjecaj čuvanja lišća različitih stupnjeva usitnjenosti na fenolni sastav vodenih infuzija.

1.1. Maslina

Maslina je gledajući kroz povijest jedna od najstarijih kultiviranih voćki. Svoj vrhunac dosegla je u 2. i 3. stoljeću, zatim nakon pada Rimskog carstva povijesni podaci o uzgoju maslina postaju znatno prorijedeći. Uzgoj maslina gubio je značaj određeni period ali je u Europi uzgoj maslina i proizvodnja maslinovog ulja procvatila tijekom 16. i 17. stoljeća jer se maslinovo ulje nije koristilo samo kao namirnica nego i za masaže, proizvodnju sapuna i obradu vune (Calabrese, *et al.*, 2012.). U Hrvatskoj se maslina cultivira uglavnom za proizvodnju maslinovog ulja. Ostaci nakon prerade maslina obično se koriste kao dodatak hrani za životinje, izvor energije za ogrjev ili se odlažu kao otpad. Listovi maslina najčešće ostaju neiskorišteni iako je dokazano da sadrže visokovrijedne biološke spojeve.

1.1.1. Sorta maslina Leccino

Sorta Leccino je jedna od glavnih talijanskih sorti maslina koja se koristi u proizvodnji talijanskih maslinovih ulja. Smatra se da potječe iz Toskane, a danas se uzgaja u cijelom svijetu. Zbog svoje intenzivne arome ulje maslina sorte Leccino obično se miješa s uljima drugih sorti. Sorta Leccino dobro raste i u hladnijim klimatskim područjima. Raste brzo, ima gustu krošnju i tendenciju da raste više kao stablo nego kao grm, po čemu se ističe u odnosu na druge sorte maslina (Kailis & Harris, 2007.)

1.1.2. Listovi maslina

Lišće maslina jedan je od nusproizvoda uzgoja maslina. Nakuplja se tijekom orezivanja stabala maslina (godišnje oko 25 kg lišća i grančica po stablu) te tijekom prerade maslina u ulje u operaciji odvajanja od plodova prije prerade (Basuny & Arafat, 2018.). Listovi maslina sadrže visoke udjele fenolnih komponenti kao što su oleuropein, verbaskozidi, apigenin-7-glukozid, luteolin-7-glukozid, hidroksitirosol i tirosol. Posljednja istraživanja impliciraju da ekstrakti maslinovih listova imaju kardioprotektivna, neuroprotektivna i antioksidativna svojstva zbog visokih koncentracija polifenolnih komponenti koje sadrže (Ferdousi, *et al.*, 2018.).

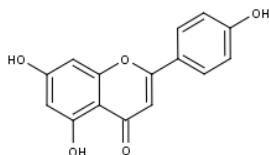
1.2. Fenolne tvari

Fenolne su tvari u prirodi prisutne u svim biljnim namirnicama i skoro svim biljkama. Pripadaju različitim skupinama, od jednostavnih kiselina do složenih kemijskih spojeva kao što su tanini i flavonoidi. Polifenoli nastaju kao sekundarni metaboliti biljaka. To su biološki aktivni kemijski spojevi sastavljeni od najmanje jednog aromatskog prstena s jednom ili nekoliko hidroksilnih skupina. S obzirom na broj prstenova koje sadrže razlikuju se flavonoidi i neflavonoidi (Slika 1.) (Kadoić, 2015.).

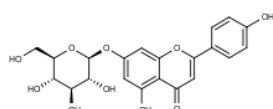
- **Flavonoidi**

Flavoni

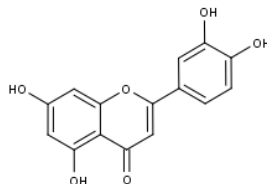
Apigenin
C₁₅H₁₀O₅



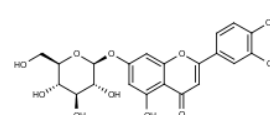
Apigenin-7-O-glukozid
C₂₁H₂₀O₁₀



Luteolin
C₁₂H₁₀O₆

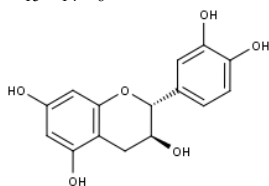


Luteolin-7-O-glukozid
C₂₁H₂₀O₁₁

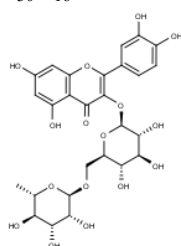


Flavonoli

Katehin
C₁₅H₁₄O₆

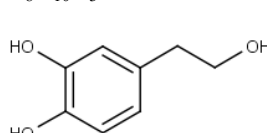


Rutin
C₂₇H₃₀O₁₆

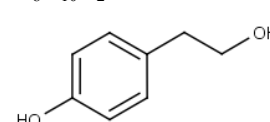


- **Fenolni alkoholi**

Hidroksitirosol
C₈H₁₀O₃

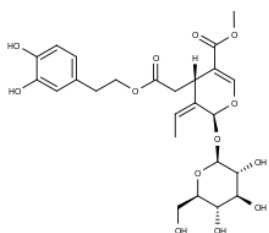


Tirosol
C₈H₁₀O₂



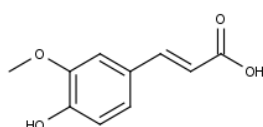
- **Sekoiridoidi**

Oleuropein
C₂₅H₃₂O₁₃

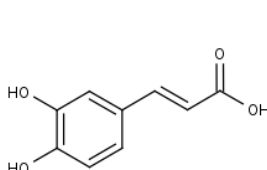


- **Fenolne kiseline**

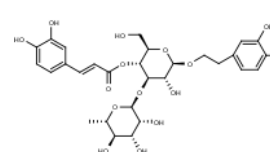
Ferulična kiselina
C₁₀H₁₀O₄



Kavska kiselina
C₉H₈O₄



Verbaskozid
C₂₉H₃₆O₅



Slika 1. Fenolni spojevi sadržani u listovima masline

Slike dostupne na <https://www.extrasynthese.com/>

1.2.1. Fenoli u listovima masline

Listovi masline sadrže polifenole, vrstu antioksidanasa koji igraju važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Prema nekim istraživanjima, ekstrakt listova masline sadrži čak više antioksidacijskih tvari od ekstrakta zelenog čaja (Basuny & Arafat, 2018.). Bogati su bioaktivnim tvarima kao što su fenolni spojevi i triterpenske kiseline. Glavni fenolni spoj koji se nalazi u listovima maslina je oleuropein. Oleuropein može činiti 6-9% suhe tvari lista masline. Hidroksitirosol i njegovi glukozidi druge su najčešće komponente listova maslina (Medina, *et al.*, 2019.). U listovima maslina mogu se još naći i cimetna kiselina, benzojeva kiselina, flavonoidi, proantocijanidini, kumarini, stilbeni, lignani i lignini (Talhaoui, *et al.*, 2015.). Međutim, kemijski sastav maslinovih listova ovisi o različitim faktorima kao što su klimatski uvjeti, starosti i sorti maslina, poljoprivrednoj praksi te korištenim postupcima ekstrakcije fenola (Ghomari, *et al.*, 2019.). Listovi maslina još nisu dovoljno iskorišteni kao izvor korisnih fenola. Fenolni spojevi iz listova također posjeduju antimikrobno i neuroprotektivno djelovanje. Ipak, u znanstvenoj literaturi dostupni su ograničeni podaci o učinku fenola iz maslinovog lišća na ljude. Naime, neke randomizirane kliničke studije pokazuju da su polifenoli maslinovog lišća povoljni modulatori krvnog tlaka, lipida u plazmi i osjetljivosti na inzulin kod ljudi s prekomjernom težinom (Peršurić, *et al.*, 2018.).

1.2.2. Fenoli u biljnim infuzijama

Popularnost biljnih infuzija u svijetu raste iz godine u godinu na globalnom nivou zbog toga što su prepoznate kao značajan izvoru fenolnih spojeva u prehrani ljudi. Blagotvorni učinci biljnih infuzija i čajeva pripisuju se antioksidacijskim svojstvima polifenolnih spojeva osobito katehinskim derivatima: epikatehinu, epigalokatehin galatu, epigalokatehinu, epikatehin galatu, galokatehinu, i katehinu. Poznato je da su listovi čajevca važan izvor metilksantina (kofein,

teobromin i teofilin) kao i aminokiselina (teanin) i minerala i elemenata u tragovima kao što su kalcij, nikel i cink, koji su neophodni za zdravlje čovjeka (Horžić, *et al.*, 2008.). Istraživanje sastava polifenola i metilksantina u zelenom, oolong, bijelom i crnom čaju te infuzijama kamilice i lipe pripremljenim na jednak način pokazalo je da zeleni čaj ima najviši udio ukupnih fenola dok infuzija lipe ima najmanji. Pokazalo se, također, da ekstrakcija vodom pri 100 °C daje bolju ekstrakciju polifenola od ekstrakcije pri 60 °C i 80 °C. Dodatak limuna značajno ne mijenja antioksidacijski kapacitet čajeva dok ga dodatak mlijeka značajno smanjuje (Horžić, *et al.*, 2008.). U istraživanju o fenolnim spojevima i antioksidacijskom djelovanju čaja od morske heljde (*Hippophaë rhamnoides*) dokazano je da se različitim postupcima sušenja dobivaju značajno različite količine fenola u napitcima te da na to utječu i sorte morske heljde (Ma, *et al.*, 2018.). Istraživanjem o utjecaju vremena čuvanja na antioksidacijski kapacitet, ukupne fenole i boju 36 tradicionalno korištenih biljaka za infuzije i čajeve u Španjolskoj dokazano je da zeleni čaj ima najveća antioksidacijska svojstva kao i sadržaj fenola, a zatim se ističe čaj od matičnjaka. Pokazano je da se nakon tromjesečnog čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi i na 50 °C izgubi čak do 50% ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (Jiménez-Zamora, *et al.*, 2016.). Istraživanje o utjecaju temperature pripreme na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća autohtonih sorti potvrdilo je neke od teza prethodnih istraživanja. Korištenjem različitih sorti dobivaju značajne razlike u koncentraciji fenola te da se korištenjem vode viših temperatura pri pripremi infuzija te koncentracije statistički značajno povećavaju (Previšić, 2019.).

1.3. Minerali

Minerali su anorganske tvari koje tijelo treba za različite funkcije. Oni uključuju formiranje kostiju i zuba, bitni su sastojci tjelesnih tekućina i tkiva, komponente su enzimskih sustava i potrebni su za normalno funkcioniranje živaca. Određeni minerali kao što su kalcij, fosfor, magnezij, natrij i kalij ljudskom organizmu potrebni su u većim količinama dok drugi

minerali, često nazvani i minerali u tragovima potrebni su organizmu u manjim količinama. Minerali u tragovima su željezo, cink, jod, fluor, selenij i bakar. Minerali se češće efikasnije apsorbiraju u tijelu ako ih hrana prirodno sadrži nego kad se unose kao dodaci prehrani (British Nutrition Foundation, 2009).

1.3.1. Željezo (Fe)

Željezo je najzastupljeniji mineral u ljudskom organizmu. Ljudski organizam sadrži 40-50 mg/kg Fe, a preporučeni unos Fe je 14 mg dnevno. Bogati izvori željeza u prehrani uključuju crveno meso, jetrice, leću, grah, orašaste plodove, lisnato povrće i sl. Većina Fe u tijelu nalazi se u eritrocitima jer mu je glavna funkcija u tijelu prijenos kisika iz pluća do tkiva, sadržaj Fe u hemoglobinu daje crvenu boju krvi. Željezo je bitna komponenta mioglobina, proteina koji opskrbljuje mišiće kisikom, te je potreban za rast, razvoj, normalno stanično funkcioniranje, sintezu nekih hormona i vezivnog tkiva. Nedostatak Fe dovodi do manjka proizvodnje hemoglobina u tijelu i nedostatne opskrbe stanica kisikom. Kada nedostatak Fe u tijelu postane ozbiljan zdravstveni problem, stanje se dijagnosticira kao sideropenična anemija. Neki od simptoma su umor, slabost, gubitak kose, razdražljivost i sl. Anemija uzrokovana nedostatkom Fe liječi se vitaminskim / mineralnim dodacima prehrani koji uključuju uobičajene sulfite, fumarate i glukonate (Al-Fartusie & Mohssan, 2017.).

1.3.2. Cink (Zn)

Cink je jedan od zastupljenijih prehrambenih esencijalnih elemenata u ljudskom tijelu. Nalazi se u svim tjelesnim tkivima, a najzastupljeniji je u kostima i mišićima. Preporučeni unos cinka dnevno procjenjuje se na 10 mg. Istraživanja su pokazala da je cink ključan u strukturi i funkciji velikog broja makromolekula te u više od 300 enzimskih reakcija. U organizmu se ioni cinka nalaze najčešće u kompleksima s proteinima i nukleinskim kiselinama te kao takvi sudjeluju u svim aspektima funkcioniranja organizma, regulaciji ekspresije genskih

informacija, skladištenju, sintezi i djelovanju peptidnih hormona i sl. (Tapiero & Tew, 2003.). Cink se nalazi u pšenici, zobi, leći, orasima, ribama i morskim plodovima. Manjak Zn pojavljuje se najčešće zbog nedovoljnog prehranbenog unosa te je najčešće zabilježen u populaciji zemalja u razvoju. Rani nedostatak Zn dovodi do oslabljene kognitivne funkcije, oslabljene imunološke funkcije, problema u ponašanju, pamćenju te do različitih neuroloških disfunkcija. Svjetska zdravstvena organizacija zagovara dodatke Zn kod teške pothranjenosti i proljeva. Dodaci Zn pomažu u prevenciji bolesti i smanjenju smrtnost, posebno među djecom (Al-Fartusie & Mohssan, 2017.).

1.3.3. Selenij (Se)

Selenij je esencijalni mikronutrijent životinja, biljaka i ljudi. Preporučeni dnevni unos Se je 55 µg dnevno. Najbolji izvori selenija iz hrane su plodovi mora, meso i cjelovite žitarice. Selenij se smatra vitalnim elementom u tragovima u ljudskom organizmu. Nalazi se na aktivnom mjestu velikog broja selenoproteina i selenocisteina te je važan u sastavu antioksidacijskih enzima. Manjak Se vrlo je rijedak kod zdravih ljudi ali ukoliko se dogodi može izazvati kognitivno propadanje, oslabljen imunološki sustav te Keshan bolest (Vlak, 2019.).

1.3.4. Minerali u biljnim infuzijama

Bilje je neizostavna komponenta prehrane ljudi. Primarni razlog uporabe različitog bilja u prehrani proizlazi iz toga da izmijene i poboljšaju okus hrane odnosno povećaju atraktivnost okusa, arome, boje i izgleda hrane. Važnu ulogu u prehrani imaju također i biljne infuzije i čajevi. Osim svojih antioksidacijskih, protuupalnih i drugih svojstava, biljne infuzije su izvor i određene količine minerala. Istraživanje koje su proveli Suliburska i Kaczmarek (2012.) govori o biljnim infuzijama iz 5 različitih biljaka: kamilice (cvijeta), mente (listova), kantariona (listova i cvjetova), kadulje (listova) i koprive (listova) kao izvoru Ca, Mg, Fe, Zn i Cu.

Istraživanjem je dokazano da se makroelementi i mikroelementi ne ekstrahiraju u potpunosti u biljnim infuzijama te da se u analiziranim infuzijama Fe najmanje ekstrahira, dok Cu postiže najveće koncentracije (Suliburska & Kaczmarek, 2012.). Istraživanje provedeno na Tajlandu bavilo se određivanjem 19 elemenata u tragovima (Mg, Al, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Sr, Sb, Ba, As, Cd, Hg, Pb) u čajevima i infuzijama biljaka jiaogulanu (*Gynostemma pentaphyllum*), kineski čajevac te bijeli dud. Koncentracije različitih elemenata varirale su ovisno o vrsti biljke te se svakodnevnim unosom (tri šalice dnevno) zadovoljavaju preporučeni dnevni unosi određenih elemenata (Nookabkaew, *et al.*, 2006.). Nadalje, u istraživanju provedenom u Poljskoj određivano je 12 različitih elemenata (Al, B, Ba, Fe, Zn, Mn, Mg, K, Na, P, Cu, Sr, Ca) u infuzijama kamilice, metvice, melise, kadulje, koprive, lipe i kantariona. Dokazano je da lišće svih biljaka sadrži sve elemente u različitim koncentracijama ovisno o vrsti biljaka (Pytlakowska, *et al.*, 2012.). S druge strane, cilj istraživanja koje su proveli Özcan i suradnici (2008.) o sadržaju minerala u različitim biljkama i njihovim infuzijama s ciljem bio je određivanja optimalnog vremena koje je potrebno za značajan prelazak minerala u infuzije. Dobiveni rezultati pokazali su da je vrijeme od 10 min najbolje za prelazak većine minerala u infuziju pa su autori zaključili da su pojedine biljne infuzije i čajevi dobar izvor minerala (Musa Özcan, *et al.*, 2008.). Prema najnovijim spoznajama koje su dobivene u istraživanju Theume i Attarda (2020.) proizlazi da što je veći sadržaj polifenola to je veći sadržaj Mn i Cu u biljnim materijalima i rezidualnim biljnim ekstraktima. Autori sugeriraju da bi proizvođači trebali testirati gotov proizvod radi utvrđivanja stvarnog sadržaja polifenola, elemenata u tragovima te njihovu međusobnu interakciju (Theuma & Attard, 2020.).

1.4. Zdravstveni učinci polifenola i minerala u biljnim infuzijama

Povijesno gledajući, ekstrakt maslinovih listova koristi se kao lijek protiv vrućice i drugih bolesti. Nekoliko je istraživanja pokazalo da ekstrakt maslinovih listova pokazuje velik spektar *in vitro* i *in vivo* svojstava. Ta svojstva podrazumijevaju antioksidacijsko djelovanje,

radiozaštitne učinke, citotoksične učinke na stanice karcinoma dojke kod ljudi i sl. Pokazalo se da oleuropein ima antioksidacijsko djelovanje na oštećenu crijevnu sluznicu kod ljudi te da oleuropein i hidroksitirosol imaju antiproliferacijski i apoptotički učinak na stanice karcinoma dojke kod ljudi (Talhaoui, *et al.*, 2015.). Neka su istraživanja pokazala da polifenoli i minerali u biljnim infuzijama osim antioksidacijskog djelovanja imaju utjecaj i na kontrolu tjelesne mase, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, imunološkog sustava te na zdravlje kostiju, a navodi se i da flavonoidi u čaju imaju povoljan učinak na pamćenje, spoznaju te ublažavaju neurodegeneraciju poboljšavanjem cerebrovaskularnog protoka krvi, iako točan mehanizam njihovog djelovanja nije još utvrđen (da Silva Pinto, 2013.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U istraživanju je postavljeno više hipoteza s ciljem da se provjeri kako na ekstraktabilnost pojedinih fenolnih i mineralnih tvari iz lista masline utječe polarnost otapala i stupanj usitnjenosti lista, te dolazi li do promjena u sastavu fenolnih tvari lista tijekom čuvanja biljnog materijala različitog stupnja usitnjenosti. Hipoteze s dizajnom pokusa prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Hipoteze i dizajn pokusa

Varijante pokusa		Redni broj hipoteze						
		1.	2.	3.		4.		5.
				a	b	a	b	
Oblik biljnog materijala	za čuvanje	-	-	mljeven	-	mljeven	-	-
		-	-	-	rezan	rezan	rezan	-
		-	-	-	-	cjelovit	cjelovit	-
	za ekstrakciju	mljeven	mljeven	mljeven	-	mljeven	-	mljeven
		-	rezan	-	rezan	-	rezan	rezan
Otapalo	metanol	-	metanol	-	metanol	-	-	
	voda	voda	-	voda	-	voda	voda	
Vrijeme čuvanja (mjeseci)	-	-	0	0	-	-	-	
			2	2	2	2	-	

Hipoteze:

1. Ekstraktabilnost pojedinih fenolnih tvari iz lista masline ovisi o polarnosti otapala
2. Ekstraktabilnost fenolnih tvari iz lista masline ovisi o stupnju usitnjenosti lista
3. Tijekom čuvanja lista masline dolazi do degradacije pojedinih fenolnih tvari
4. Oblik čuvanja lista utječe na stupanj degradacije pojedinih fenolnih tvari
5. Ekstraktabilnost mineralnih tvari ovisi u usitnjenosti listova masline

Budući da vodeni ekstrakti predstavljaju model biljne infuzije, cilj je bio i utvrditi doprinos jedne porcije takvog napitka preporučenom unosu pojedinih bioaktivnih fenolnih tvari odnosno pojedinih mineralnih tvari.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci listova masline

U ovom radu za pripremu infuzija korišteni su listovi masline sorte Leccino (Slika 2.). Listovi su uzorkovani sredinom veljače 2020. godine u ekološkom masliniku u blizini Zadra, podignutom 2010. godine. Uzorak lišća, mase jednog kilograma, prikupljen je s 50 stabala maslina a listovi su uzorkovani sa srednjeg izboja grančica.



Slika 2. Prikaz osušenih listova masline sorte Leccino

3.1.2. Standardi i kemikalije

Sljedeće su kemikalije korištene za određivanje i ekstrakciju sastava fenolnih tvari u pripremljenim vodenim infuzijama i listovima:

- Fosforna kiselina, Sigma-Aldrich, SAD (2%-tna vodena otopina, V:V),
- Metanol, HPLC gradient grade, Merck KgaA, Njemačka (80% i 100%, V:V),
- Acetonitril, HPLC gradient grade, Merck KgaA, Njemačka.

Za kvantifikaciju fenolnih tvari u vodenim infuzijama i listovima i identifikaciju istih korištene su standardne tvari:

- Vanilin HPLC čistoće $\geq 99\%$, verbaskozid HPLC čistoće $\geq 99\%$, kavaska kiselina HPLC čistoće $\geq 99\%$, tirosol HPLC čistoće $\geq 99\%$, ferulična kiselina HPLC čistoće $\geq 90\%$, hidroksitirosol HPLC čistoće $\geq 98\%$, rutin HPLC čistoće $\geq 99\%$, katehin HPLC čistoće $\geq 99\%$, luteolin-7-O-glukozid HPLC čistoće $\geq 98\%$, luteolin HPLC čistoće $\geq 99\%$, apigenin-7-O-glukozid HPLC čistoće $\geq 99\%$, apigenin HPLC čistoće $\geq 99\%$, oleuropein HPLC čistoće $\geq 98\%$, oleanolična kiselina HPLC čistoće $\geq 99\%$.

Extrasynthese (Francuska) proizvođač je standarda svih fenolnih tvari.

Određivanje i ekstrakcija sadržaja mineralnih komponenti u vodenim otopinama i listovima masline provedena je sljedećim kemikalijama:

- dušična kiselina, Suprapur, Merck, Njemačka, (2% -tna vodena otopina, V:V),

Standardna otopina korištena za kvantifikaciju i identifikaciju mineralnih komponenti u vodenim otopinama i listovima masline:

- standardna otopina s više elemenata, Perkin Elmer, SAD

3.1.3. Uređaji i pribor

Sljedeći su se uređaji rabili za pripravu ekstrakta minerala i fenola iz listova masline:

- aparat za mljevenje, tip 8832-D, Casa nuova, Kina,
- centrifuga, Bench-top Versatil, Electra Medical Corporation, SAD,
- električni grijači s kalotama, INKO, Hrvatska,
- semimikro analitička vaga, Mettler Toledo, Švicarska,
- sterilizator – sušionik ST-80, INKO, Hrvatska,
- ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex Digitec, Njemačka (140/560 W, 35 kHz),
- metalno sito (Retsch, Njemačka) – promjer sita 20 cm, promjer rupica na situ 200 μm

Uređaji korišteni za provedbu analitičkih mjerenja su sljedeći:

- induktivno spojeni plazma maseni spektrometar, ICP MS NexION 300X s autouzorkivačem (Perkin Emler, USA).
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti UltiMate 3000 (Dionex, TermoFisher Scientific, SAD) s UV-VIS detektorom (UltiMate 3000 VWD Variable Wavelength Detector),

Potrošni materijal i pribor:

- automatske pipete, Eppendorf Research, Njemačka,
- disk filtri od celuloznog acetata (promjera 13 mm, veličina pora 0,45 μm), Filtres Fioroni, Francuska,
- ostali pribor i materijal: filtarski papir (crna vrpca), škare za rezanje začinskog bilja, aluminijske posude, metalne žlice i špatule, gumene propipete, stalci za epruvete, termometri.
- 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 (100 mL), staklene čaše (50 mL, 100 mL, 250 mL), staklene teglice (50 mL) s čepovima na navoj, staklene epruvete od 15 i s PP čepovima na navoj (Duran, Njemačka), trbušaste pipete (20 mL), menzure, Pasteur pipete,
- viala volumena 2 mL, PTFE/silikonske septe promjera 8 mm i polipropilenski čepovi s otvorom 8 mm za viala (Restek, SAD).

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje oblika, dužine i širine listova

Svojstva lista određena su prema metodi Međunarodnog vijeća za masline za primarnu karakterizaciju sorti maslina (IOC, 1997). Iz homogene mase lišća, nasumičnim odabirom izdvojeno je 100 listova. Svakom listu izmjerena je dužina i širina, a na temelju omjera prosječne dužine i širine lista određen je oblik lista.

- S obzirom na prosječnu:
 - dužinu, list može biti: kratak (< 5 cm), srednje dug ($5 - 7$ cm) i dug (> 7 cm),
 - širinu, list može biti: uzak (< 1 cm), srednje širok ($1 - 1,5$ cm) i širok ($> 1,5$ cm).
- Prema obliku definiranom omjerom prosječne dužine i širine, list može biti: eliptičan (omjer < 4), eliptično kopljast (omjer $4 - 6$) i kopljast (omjer > 6).

3.2.2. Sušenje i određivanje udjela suhe tvari u listovima masline

Lišće je podijeljeno u 13 aluminijskih posuda i sušeno na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase. Sušeno je i vagano sve dok razlika između dviju uzastopnih odvaga nije bila manja od 10 mg, s 30 minutnim intervalima sušenja. Prilikom sušenja određen je udjel suhe tvari.

3.2.3. Priprema listova masline za analiziranje

Poslije uzorkovanja i prijevoza u laboratorij listovi masline isprani su običnom vodovodnom vodom, nakon toga su isprani destiliranom vodom u tri navrata i ostavljeni da se cijede. Oprani listovi obrisani su ubrusima od papira i osušeni u sušioniku. Listovi su maslina čuvani u vrećicama od papira na sobnoj temperaturi (zaštićeni od svjetla) sve dok se nisu priređivali ekstrakti za određivanje fenolnog sastava.

3.2.4. Ekstrakcija fenolnih tvari iz listova masline

Prije ekstrakcije fenolnih tvari, listovi su mljeveni mlinom i prosijani preko metalnog sita (promjer rupica sita 200 μm) kako bi se dobio materijal podjednake usitnjenosti. Sukladno postupku opisanom od strane Marinove *et al.* (2005) provedena je ekstrakcija svih fenolnih supstanci. U malu staklenu teglu s navojnim čepom odvagalo se je 0,50 g usitnjenih maslinovih listova u koje se dodalo 20 mL 80 %-tnog metanola (V:V). Uzorci spravljeni na takav način prebačeni su u ultrazvučnu kupelj gdje su se ekstrahirali 20 min. Nakon završene ekstrakcije temperirani su uzorci na 20 ± 2 °C u vodenoj kupelji jer su se zagrijali tokom ultrazvučne ekstrakcije. Metanolni ekstrakti (13,5 mL) prebačeni su u plastične epruvete s čepovima na navoj i centrifugirani na 4000 o/min u trajanju 7 minuta. Ekstrakti su, nakon što su izbistreni centrifugiranjem pažljivo preneseni u staklene epruvete s čepom i pripremljeni za analizu tekućinskom kromatografijom.

3.2.5. Priprema vodenih infuzija listova masline

Infuzije su priređene prelijevanjem 2,00 g rezanih maslinovih listova s 100 mL vode na 100 °C u ili 1,00 g mljevenih maslinovih listova (usitnjenost materijala manja od 200 μm) sa 100 mL vode na 100 °C. Poslije prelijevanja listova vodom, staklene su čaše poklopljene satnim stakalcima i stavljene u zagrijan sušionik (100 °C). Nakon što je isteklo vrijeme pripreme od 5 minuta, vodene su infuzije filtrirane preko filtarskog papira u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu tikvice su dopunjene destiliranom vodom do oznake. Svaka infuzija pripremljena je u pet ponavljanja. Izbistrene infuzije su prenesene u staklene epruvete s čepom te su pripravljene za analizu tekućinskom kromatografijom. Infuzije iz cjelovitih listova koji su u takvom obliku skladišteni dva mjeseca, pripremane su na način da su se listovi neposredno prije pripreme infuzije rezali te se 2,00 g takvog rezanog materijala

prelijevalo s 100 mL destilirane vode na 100 °C. Nakon prelijevanja listova vodom postupak je tekao identično kao pripreme mljevenih te rezanih listova.

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

Bistri ekstrakti fenolnih tvari u metanolu te vodene infuzije profiltrirani su preko disk filtra od celuloznog acetata, koji je pretkodno navlažen odgovarajućim otapalom, u viala od stakla volumena 2 mL te su zatvorene septama i polipropilenskim čepovima.

3.2.7. Određivanje sastava fenolnih tvari tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) s UV-VIS detektorom korišten je za provođenje analiza pojedinačnih fenola. U Tablici 2. prikazani su uvjeti prema kojima se uzorak gradijentno eluirao. 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 radi uklanjanja zaostalih mjehurića zraka. Omjer otapala tijekom analize mijenjao se gradijentno kao što je prikazano 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

Deset minuta bilo je vrijeme uspostavljanja ravnoteže, a 105 minuta trajala je ukupna analiza. 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				
	210 nm	250 nm	280 nm	305 nm	370 nm
Fenolni spoj	Oleanolična kiselina	Oleuropein Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	Katehin Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid Hidroksitirozol Tirozol Vanilin	Apigenin Ferulična kiselina Kavska kiselina Verbaskozid	Luteolin Rutin

Pojedinačne fenolne supstance identificirale su se usporedbom s vremenom zadržavanja čistih standardnih supstanci. Metodom vanjskog standarda provedena je kvantifikacija. 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, ThermoFisher Scientific, SAD) izrađeni su baždarni pravci nanošenjem poznatih koncentracija standardnih tvari na os x i površine pikova na os y. Izračunavanje masenih udjela fenolnih supstanci rađeno je pomoću baždarnih pravaca za svaku pojedinu supstancu zatim preračunavanjem na masu listov uzetih za ekstrahiranje ili za priređivanje vodenih infuzija.

Prijelaz je fenolnih tvari iz listova u vodene infuzije prikazan u postocima te računat prema formuli:

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

gdje je:

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

3.2.8. Određivanje mineralnih tvari induktivno spojenim plazma masenim spektrometrom

Koncentracije metala u infuzijama određene su korištenjem induktivno spojenog plazma masenog spektrometra, ICP MS NexION 300X, opremljenog s S10 autosamplerom (Perkin Elmer, SAD). Za pripremu kalibracijskih krivulja korištena je standardna otopina s više elemenata (Perkin Elmer, SAD). Kalibracijske krivulje s $R^2 > 0,999$ prihvaćene su za proračun koncentracije.

3.2.9. Statistička obrada rezultata

Dobiveni su rezultati pokusnih mjerenja izraženi kao srednje vrijednosti četiri (metanol) odnosno pet (voda) replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem uz pripadajuće standardne devijacije. Jednosmjerna analiza varijance (*one-way ANOVA*) korištena je za testiranje masenih udjela fenolnih i mineralnih tvari. Uz pomoć Tukey testa značajnih razlika – *The Tukey's honest significant difference test – HSD* ($p < 0,05$) uspoređivale su se srednje vrijednosti rezultata, a procjena jednakosti varijacija među rezultatima testirana je *Leveneovim* testom. *Microsoft Office Excel 2016* korišten je prije statističke obrade za pripremu rezultata, a svi su statistički testovi rađeni uz pomoć programskog paketa *Statistica* verzija 13.3. (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija – SAD).

4. REZULTATI

Listovi masline sorte Leccino korišteni u ovom istraživanju bili su srednje duljine ($5,3 \pm 0,5$ cm) i srednje širine ($1,3 \pm 0,1$ cm). Prema obliku definiranom omjerom listovi su bili eliptično kopljasti (omjer prosječne dužine i širine 4,05 cm). Određeni udio suhe tvari u listovima iznosio je $55,2 \pm 0,5$ %.

Od fenolnih tvari uključenih u identifikacijski postupak, vanilinska kiselina i diosmetin nisu detektirani ni u jednoj od provedenih analiza. Stoga su te dvije fenolne tvari izostavljene iz prikaza rezultata u svim tablicama ovog poglavlja.

4.1. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vrsti otapala za ekstrakciju

U Tablici 4. prikazani su maseni udjeli fenolnih tvari u mljevenom listu masline utvrđeni primjenom ekstrakcije različitim otapalima (metanol, voda). Rezultati se odnose na varijantu pokusa kojom je testirana 1. hipoteza (ekstraktabilnost pojedinih fenolnih tvari iz lista masline ovisi o polarnosti otapala).

Tablica 4. Maseni udio¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o otapalu i uvjetima ekstrakcije

Fenolne tvari	Otapalo	
	Metanol ² pri 20 °C	Voda ³ pri 100 °C
Hidroksitirosol	222,4 ± 1,8 a	403,6 ± 20,6 b
Tirosol	77,1 ± 6,5	85,5 ± 12,9
4-hidroksibenzoična kiselina	227,9 ± 16,9 a	53,8 ± 4,9 b
Katehin	n. d. ⁴	n. d.
Kavska kiselina	114,9 ± 0,6	112,0 ± 8,9
Vanilin	n. d.	n. d.
Ferulična kiselina	n. d.	n. d.
Verbaskozid	1.479,9 ± 3,9 a	1.332,9 ± 89,3 b
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	9.871,3 ± 76,6 a	7.161,7 ± 462,2 b
Rutin	1.544,3 ± 41,3 a	1.307,7 ± 116,2 b
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	992,9 ± 13,8 a	719,7 ± 43,7 b
Oleuropein	57.145,1 ± 843,7 a	49.681,3 ± 3.687,5 b
Luteolin	85,5 ± 11,2	n. d.
Apigenin	n. d.	n. d.
Oleanolična kiselina	19.655,1 ± 1.980,7	n. d.
Ukupne fenolne tvari ⁵	91.416,5 ± 2.364,6 a	60.858,2 ± 4.333,2 b

¹ Rezultati su srednje vrijednosti četiri (metanol) odnosno pet (voda) replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija. Različita slova unutar istog retka označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test, $p < 0,05$) između otapala.

² Ekstrakcija provedena s 0,5 g suhog mljevenog lista u 20 mL 80 %-tnog metanola pri 20 °C / 20 min pod ultrazvukom

³ Ekstrakcija provedena s 1,0 g suhog mljevenog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min

⁴ n.d. – nije detektirano

⁵ Dobivene zbrajanjem masenih udjela pojedinačnih fenolnih tvari

4.2. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o stupnju usitnjenosti lista prilikom ekstrakcije

U Tablici 5. prikazane su vrijednosti fenolnih tvari utvrđene u različito usitnjenim listovima masline podvrgnutim ekstrakciji vodom. Rezultati se odnose na varijantu pokusa kojom je testirana 2. hipoteza (ekstraktabilnost fenolnih tvari iz lista masline ovisi o stupnju usitnjenosti lista).

Tablica 5. Maseni udio¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o usitnjenosti biljnog materijala i uvjetima ekstrakcije

Fenolne tvari	Oblik usitnjenosti lista	
	Mljeveno ²	Rezano ³
Hidroksitirosol	403,6 ± 20,6 a	177,4 ± 11,9 b
Tirosol	85,5 ± 12,9 a	48,1 ± 4,6 b
4-hidroksibenzoična kiselina	53,8 ± 4,9 a	13,6 ± 1,5 b
Katehin	n. d. ⁴	n. d.
Kavska kiselina	112,0 ± 8,9 a	39,0 ± 2,0 b
Vanilin	n. d.	n. d.
Ferulična kiselina	n. d.	n. d.
Verbaskozid	1.332,9 ± 89,3 a	383,1 ± 44,7 b
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	7.161,7 ± 462,2 a	1.546,3 ± 50,9 b
Rutin	1.307,7 ± 116,2 a	189,8 ± 21,5 b
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	719,7 ± 43,7 a	144,1 ± 8,0 b
Oleuropein	49.681,3 ± 3687,5 a	13.953,7 ± 724,9 b
Luteolin	n. d.	n. d.
Apigenin	n. d.	n. d.
Oleanolična kiselina	n. d.	n. d.
Ukupne fenolne tvari ⁵	60.858,2 ± 4.333,2 a	16.495,0 ± 828,9 b

¹ Rezultati su srednje vrijednosti pet replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija; n. d. = nije detektirano. Različita slova nakon brojčanih vrijednosti unutar istog retka označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test, $p < 0,05$) između oblika usitnjenosti.

² Ekstrakcija provedena s 1,0 g suhog mljevenog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min

³ Ekstrakcija provedena s 2,0 g suhog rezanog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min

⁴ n.d. – nije detektirano

⁵ Dobivene zbrajanjem masenih udjela pojedinačnih fenolnih tvari

4.3. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vremenu čuvanja listova prije ekstrakcije

U Tablici 6. prikazani su maseni udjeli fenolnih tvari u listovima masline podvrgnutim ekstrakciji neposredno nakon uzorkovanja i sušenja te nakon 2 mjeseca čuvanja biljnog materijala. Rezultati se odnose na varijantu pokusa kojom je testirana 3. hipoteza (tijekom čuvanja lista masline dolazi do degradacije pojedinih fenolnih tvari).

Tablica 6. Maseni udio¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o čuvanju biljnog materijala prije ekstrakcije

Fenolne tvari	Otapalo / vrijeme čuvanja / oblik čuvanja			
	Metanol ² 0 mjeseci Mljeveno	Metanol ² 2 mjeseca mljeveno	Voda ³ 0 mjeseci Rezano	Voda ³ 2 mjeseca Rezano
Hidroksitirozol	222,4 ± 1,8 a	333,5 ± 7,6 b	177,4 ± 11,9	186,1 ± 9,9
Tirosol	77,1 ± 6,5 a	127,7 ± 2,7 b	48,1 ± 4,6 c	63,0 ± 6,9 d
4-hidroksibenzoična kiselina	227,9 ± 16,9 a	n. d. ⁴	13,6 ± 1,5 c	n. d.
Katehin	n. d.	78,5 ± 13,6 b	n. d.	24,3 ± 7,1 d
Kavska kiselina	114,9 ± 0,6 a	15,8 ± 5,9 b	39,0 ± 2,0 c	4,3 ± 2,0 d
Vanilin	n. d.	23,6 ± 0,5 b	n. d.	17,6 ± 5,5 d
Ferulična kiselina	n. d.	24,0 ± 1,6 b	n. d.	7,5 ± 0,8 d
Verbaskozid	1.479,9 ± 3,9 a	1.381,5 ± 56,0 b	383,1 ± 44,7	341,8 ± 36,6
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	9.871,3 ± 76,6 a	8.906,2 ± 35,2 b	1.546,3 ± 50,9 c	1.333,7 ± 63,0 d
Rutin	1.544,3 ± 41,3 a	883,7 ± 47,2 b	189,8 ± 21,5	198,8 ± 7,5
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	992,9 ± 13,8 a	1.463,4 ± 6,2 b	144,1 ± 8,0 c	206,2 ± 10,1 d
Oleuropein	57.145,1 ± 843,7 a	61.335,1 ± 178,6 b	13.953,7 ± 724,9 c	13.041,8 ± 666,8 d
Luteolin	85,5 ± 11,2 a	320,8 ± 7,6 b	n. d.	42,1 ± 4,2 d
Apigenin	n. d.	22,5 ± 2,1 b	n. d.	0,9 ± 0,4 d
Oleanolična kiselina	19.655,1 ± 1.980,7	20.835,6 ± 671,9	n. d.	n.d.
Ukupne fenolne tvari ⁵	91.416,5 ± 2.364,6 a	95.754,9 ± 646,4 b	16.495,0 ± 828,9 c	15.467,9 ± 820,9 d

¹Rezultati su srednje vrijednosti četiri (metanol) odnosno pet (voda) replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija. Različita slova u istom retku unutar pojedinog otapala označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test, $p < 0,05$) uslijed čuvanja biljnog materijala.

² Ekstrakcija je provedena s 0,5 g suhog mljevenog lista u 20 mL 80 %-tnog metanola pri 20 °C / 20 min pod ultrazvukom

³ Ekstrakcija provedena s 2,0 g suhog mljevenog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min

⁴ n.d. – nije detektirano

⁵ Dobivene zbrajanjem masenih udjela pojedinačnih fenolnih tvari

4.4. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisi o obliku čuvanja listova prije ekstrakcije

U Tablici 7 i 8 prikazani su maseni udjeli fenolnih tvari u listovima masline sorte Leccino ovisno o obliku čuvanja listova prije ekstrakcije. Rezultati se odnose na varijantu pokusa kojom je testirana 4. hipoteza (oblik čuvanja lista utječe na stupanj degradacije pojedinih fenolnih tvari).

Tablica 7. Maseni udio¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o obliku čuvanja biljnog materijala (ekstrakcija metanolom nakon 2 mjeseca čuvanja²)

Fenolne tvari	Oblik čuvanja		
	Mljeveno	Rezano	Cjelovito
Hidroksitirozol	333,5 ± 7,6 ± 7,6 a	336,1 ± 9,1 a	327,2 ± 7,2 a
Tirosol	127,7 ± 2,7 b	140,6 ± 3,3 a	137,2 ± 2,5 a
4-hidroksibenzoična kiselina	n. d. ³	n. d.	n. d.
Katehin	78,5 ± 13,6 a	85,0 ± 15,7 a	89,9 ± 18,6 a
Kavska kiselina	15,8 ± 5,9 a	16,0 ± 5,1 a	17,9 ± 1,8 a
Vanilin	26,6 ± 0,5 a	26,0 ± 2,1 a	26,1 ± 1,0 a
Ferulična kiselina	24,0 ± 1,6 a	25,0 ± 3,1 a	25,7 ± 1,9 a
Verbaskozid	1.381,5 ± 56,0 b	1.481,0 ± 27,6 a	779,8 ± 10,3 c
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	8.906,2 ± 35,2 a	7.927,0 ± 110,3 c	8.480,3 ± 102,1 b
Rutin	883,7 ± 47,2 a	675,3 ± 51,2 b	851,5 ± 43,5 a
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	1.463,4 ± 6,2 a	1.345,5 ± 18,3 c	1.400,6 ± 30,4 b
Oleuropein	61.335,1 ± 178,6 a	62.173,6 ± 299,2 a	62.816,5 ± 763,6 c
Luteolin	320,8 ± 7,6 a	330,3 ± 13,4 a	322,6 ± 3,9 a
Apigenin	22,5 ± 2,1 a	19,4 ± 0,3 b	16,9 ± 0,4 b
Oleanolična kiselina	20.835,6 ± 671,9 a	20.680,8 ± 1040,1 a	23.633,5 ± 852,3 c
Ukupne fenolne tvari ⁴	95.754,9 ± 646,4 a	95.261,6 ± 963,8 a	98.925,9 ± 1308,4 c

¹ Rezultati su srednje vrijednosti četiri replike postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija. Različita slova unutar istog retka označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test, $p < 0,05$) između oblika čuvanja biljnog materijala.

² Ekstrakcija je provedena s 0,5 g suhog mljevenog biljnog materijala u 20 mL 80 %-tnog metanola pri 20 °C / 20 min pod ultrazvukom

³ n.d. – nije detektirano

⁴ Dobivene zbrajanjem masenih udjela pojedinačnih fenolnih tvari

Tablica 8. Maseni udio¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o obliku čuvanja biljnog materijala (ekstrakcija vodom nakon 2 mjeseca čuvanja)

Fenolne tvari	Oblik čuvanja	
	Rezano ²	Cjelovito ²
Hidroksitirosol	186,1 ± 9,9	198,1 ± 11,8
Tirosol	63,0 ± 6,9	70,9 ± 6,9
4-hidroksibenzoična kiselina	n. d. ³	n. d.
Katehin	24,3 ± 7,1	20,8 ± 1,5
Kavska kiselina	4,3 ± 2,0	5,1 ± 1,4
Vanilin	17,6 ± 5,5 a	8,7 ± 1,1 b
Ferulična kiselina	7,5 ± 0,8	7,3 ± 1,2
Verbaskozid	341,8 ± 36,6	353,0 ± 88,6
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	1.333,7 ± 63,0	1.367,8 ± 84,4
Rutin	198,8 ± 7,5	197,0 ± 10,0
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	206,2 ± 10,1	215,2 ± 7,9
Oleuropein	13.041,8 ± 666,8	13.583,8 ± 772,2
Luteolin	42,1 ± 4,2	37,8 ± 3,5
Apigenin	0,9 ± 0,4	0,6 ± 0,1
Oleanolična kiselina	n. d.	n. d.
Ukupne fenolne tvari ⁴	15.467,9 ± 740,5	16.066,0 ± 725,4

¹ Rezultati su srednje vrijednosti pet replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija. Različita slova nakon brojeanih vrijednosti unutar istog retka označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test, $p < 0,05$) između oblika čuvanja biljnog materijala.

² Ekstrakcija je provedena s 2,0 g suhog rezanog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min nakon čuvanja u rezanom obliku, odnosno s 2,0 g suhog rezanog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min nakon čuvanja u cjelovitom obliku.

³ n.d. – nije detektirano

⁴ Dobivene zbrajanjem masenih udjela pojedinačnih fenolnih tvari

4.5. Nutritivne karakteristike vodenih infuzija maslinovog lišća sorte Leccino

Tablica 9 prikazuje masene koncentracije hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u jednoj šalici (200 mL) različitih infuzija maslinovog lišća sorte Leccino koje su pripravljane u ovom istraživanju, dok Tablica 10 sadrži masene koncentracije minerala (Fe, Zn, Se) u jednoj šalici. U obje tablice naveden je doprinos jedne šalice unosu fenolnih tvari sa zdravstvenim učinkom odnosno doprinos dnevnom preporučenom unosu željeza, cinka i selenija.

Tablica 9. Masene koncentracije¹ hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u infuzijama sorte Leccino pri različitim uvjetima pripreme, s usporedbom prema minimalnom unosu za postizanje zdravstvenog učinka

Infuzije ²	Derivati hidroksitirosola (mg/200 mL)	Višekratnik unosa iz pojedine infuzije u odnosu na minimalni unos putem djevičanskog maslinovog ulja za isticanje zdravstvene tvrdnje ³
1.	102,84 ± 7,59	20,6 ± 1,5
2.	56,03 ± 3,08	11,6 ± 0,6
3.	54,28 ± 2,70	10,9 ± 0,5
4.	56,54 ± 2,93	11,3 ± 0,6

¹ Rezultati su srednje vrijednosti pet replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija.

² Infuzija 1. Ekstrakcija je provedena s 1,0 g suhog mljevenog lista / 100 mL destilirane vode bez čuvanja biljnog materijala.

Infuzija 2. Ekstrakcija je provedena s 2,0 g suhog rezanog lista / 100 mL destilirane vode bez čuvanja biljnog materijala.

Infuzija 3. Ekstrakcija je provedena s 2,0 g suhog rezanog lišća / 100 mL destilirane vode, materijal za ekstrakciju je rezan i čuvan 2 mjeseca u rezanom obliku.

Infuzija 4. Ekstrakcija je provedena s 2,0 g suhog rezanog lišća / 100 mL destilirane vode, materijal za ekstrakciju je rezan nakon čuvanja u cjelovitom obliku 2 mjeseca.

³ „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidacijskog stresa“ - ulja moraju sadržavati minimalno 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata u uobičajenoj dnevnoj porciji (20 g ulja)

Tablica 10. Mase¹ Fe, Zn, Se sadržane u jednoj šalici (200 mL) infuzija lista masline sorte Leccno, s udjelom doprinosa preporučenom dnevnom unosu² (PDU)

Minerali	Infuzija pripremljena iz:			
	Mljevenog lista ³		Rezanog lista ³	
	Mljeveno	% PDU	Rezano	% PDU
Fe	0,028 ± 0,006 mg a	0,21	0,047 ± 0,006 mg b	0,36
Zn	0,084 ± 0,016 mg a	0,80	0,352 ± 0,104 mg b	3,50
Se	0,076 ± 0,003 µg a	0,14	0,085 ± 0,006 µg b	0,15

¹ Rezultati su srednje vrijednosti pet replika postupka ekstrakcije biljnog materijala s po jednim mjerenjem ± standardna devijacija. Različita slova nakon brojčanih vrijednosti unutar istog retka označavaju statističke značajne razlike (Tukeyev test, $p < 0,05$) između oblika čuvanja biljnog materijala.

² Prema Uredbi (EU) 1196/2011, DPU za navedene minerale iznosi: Fe – 14 mg, Zn – 10 mg, Se – 55 µg

³ Ekstrakcija provedena s 1,0 g suhog mljevenog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min, odnosno s 2,0 g suhog rezanog lista u 100 mL vode pri 100 °C / 5 min

5. RASPRAVA

U ovom radu istražen je fenolni sastav vodenih infuzija lista masline sorte Leccino, te fenolni sastav lista u ovisnosti o vrsti otapala za ekstrakciju, stupnju usitnjenosti listova prilikom ekstrakcije te vremenu i obliku čuvanja listova prije ekstrakcije. Listovi su ubrani jednokratno u istom masliniku i čuvani do pripreme ekstrakata pod istim uvjetima da bi ostali izvori varijacija bili svedeni na najmanju moguću mjeru.

5.1. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vrsti otapala za ekstrakciju

Dosadašnja istraživanja pokazala su da ekstrakcija fenola iz biljnog materijala ovisi o vrsti i koncentraciji korištenih otapala, kao npr. u slučaju ekstrakcije iz đumbira korištenjem metanola, acetona i kloroforma (Ghasemzadeh, *et al.*, 2011.). Prilikom određivanja fenolnih tvari u biljnom materijalu, te za pripremu fenolnih ekstrakata iz biljnog materijala, često se kao otapala koriste metanol ili etanol (Previšić, 2019.; Ma, *et al.*, 2018.; Dent, *et al.*, 2013.; Mujčić, *et al.*, 2011.) Stoga su i za ovo istraživanje, radi usporedbe otapala za ekstrakciju, odabrani metanol odnosno voda, a rezultati su prikazani u Tablici 4. Postupak s metanolom, potpomognut ultrazvukom, pokazao se statistički značajno učinkovitiji u ekstrakciji većine identificiranih fenolnih komponenti, s izuzetkom tirosola i kavske kiseline. Udio ukupnih fenolnih tvari ekstrahiranih vrućom vodom bio je za 33% manji u odnosu na metanol. Nadalje, u metanolnom ekstraktu identificirana je oleanolična kiselina u značajnoj količini (oko 20 g/kg s.t. lista), dok u vodenoj infuziji uopće nije identificirana.

Slično istraživanje provele su Peršurić i suradnice (2019.) na listovima maslina sorti Leccino, Istarska bjelica i Buža, te su također utvrdile veću efikasnost metanola potpomognutog ultrazvukom u odnosu na vruću vodu (u prosjeku za 62%). Ghomari i suradnici (2019.) su u svrhu ekstrakcije fenolnih tvari macerirali listove maslina 4 h u 80%-tnom etanolu, 20%-tnom

acetonitrilu, te hladnoj i vrućoj destiliranoj vodi (60 °C). U njihovom se istraživanju najboljom pokazala ekstrakcija etanolom, te nešto manje učinkovita ekstrakcija vrućom destiliranom vodom. Theuma i suradnici (2020.) navode da se učinkovitost vruće vode može pripisati većoj dostupnosti fenolnih tvari uslijed razaranja staničnih stjenki i staničnih komponenti. Ovi autori također ističu da ekstrakcija fenolnih tvari ovisi o biljnom matriksu i specifičnim kemijskim svojstvima fenola (molekularna struktura, polarnost, koncentracija i broj aromatskih prstena te broj hidroksilnih skupina) karakterističnih za pojedine biljne vrste. S druge strane, ekstrakcija fenolnih tvari vrućom vodom može biti otežana zbog stvaranja kompleksa s drugim metabolitima sadržanim u biljnom matriksu, kao što su bjelančevine i ugljikohidrati.

5.2. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o stupnju usitnjenosti lista prilikom ekstrakcije

Istraživanjem učinka stupnja usitnjenosti lista čajevca ili lista masline na ekstrakciju fenolnih tvari bavilo se do sada nekoliko skupina istraživača (Kopjar, *et al.*, 2015.; Dmowski, *et al.*, 2014.; Kovačić, *et al.*, 2017; Casazza, *et al.*, 2017). Dmowski i suradnici (2014.) utvrdili su da prilikom pripreme infuzije crnog čaja stupanj fragmentacije listova (cijeli listovi, granule i fino usitnjen materijal) nije imao značajan utjecaj na koncentraciju fenolnih tvari u infuzijama. Međutim, u ostalim trima navedenim istraživanjima stupanj usitnjenosti bio je značajan faktor povećanja učinkovitosti ekstrakcije fenolnih tvari, što je potvrđeno i u ovom istraživanju listova masline sorte Leccino. Tako su Kopjar i suradnice (2015.), uspoređujući ekstrakciju fenolnih tvari metanolom iz cjelovitih i fino usitnjenih listova zelenog, žutog i crnog čaja, utvrdile dvostruko veće vrijednosti dobivene iz usitnjenog materijala. Kovačić i suradnice (2017.) pripremale su infuzije iz fino usitnjenih (promjer 0,15 mm), grubo usitnjenih (promjer 4 mm) i cjelovitih listova tri različite sorte maslina (Rosinjole, Buže i Istarske bjelice). Utvrdile su izrazite i statistički značajne razlike u koncentraciji fenolnih tvari u korist fino usitnjenog materijala nakon 5 minuta ekstrakcije, ali su se razlike između cjelovitih i usitnjenih listova

uočljivo smanjile nakon 15 i 30 minuta pripreme infuzija. Casazza i suradnici (2017.) istraživali su ovisnost usitnjenosti listova masline sorte Taggiasca i fenolnog sastava infuzijski te dekokcijski dobivenih otopina fenolnih tvari. Koristili su četiri frakcije fino usitnjenih listova (približnih promjera 2-5 mm, 1-2 mm, 0,8-1 mm te 0,6-0,8 mm). Utvrdili su da kod infuzijskog načina pripreme (3 minute odležavanja materijala prelišenog kipućom vodom) koncentracija fenolnih tvari raste gotovo linearno sa smanjenjem veličine čestica, ali da se kod dekokcijskog postupka (15 minuta kuhanja) glavni učinak u povećanju koncentracije postiže između promjera čestica 2-5 mm i 1-2 mm, a da se koncentracija daljnjim smanjenjem promjera čestica bitno ne mijenja.

Rezultati o utjecaju stupnja usitnjenosti listova proizašli iz istraživanja u okviru ovog diplomskog rada prikazani su u Tablici 5, a usporedivi su s obzirom na uvjete pripreme (ekstrakcija vodom 3 min na 100 °C) s rezultatima za sortu Taggiasca (Casazza, *et al.*, 2017). Uočava se da veći stupanj usitnjenosti listova masline sorte Leccino značajno doprinosi povećanju količine ekstrahiranih ukupnih fenolnih tvari. Maseni udio ukupnih fenola ekstrahiranih iz mljevenih listova je za oko 4 puta veći u odnosu na vrijednost dobivenu iz rezanih listova. Tomu doprinose sve identificirane komponente, a osobito složene molekule (rutin, apigenin-7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukozid, oleuropein i verbaskozid).

5.3. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisno o vremenu čuvanja listova prije ekstrakcije

Postavljanje hipoteze o degradaciji pojedinih fenolnih tvari tijekom čuvanja lista masline prije ekstrakcije temeljilo se na spoznajama iz nekoliko prethodno objavljenih istraživanja. Jiménez-Zamora i suradnici (2016.) istražili su promjene fenolnih tvari nakon tri i šest mjeseci čuvanja kod 36 biljnih vrsta koje se tradicionalno konzumiraju u obliku vodenih infuzija u Španjolskoj, među njima i listova maslina. Utvrdili su da je kod dvije trećine uključenih biljnih vrsta glavni gubitak ukupnih fenola nastao nakon tri mjeseca čuvanja pri

sobnoj temperaturi, u prosjeku za oko 33% te u rasponu od 7 do 77%. Friedman i suradnici (2010.) promatrali su promjene katehina tijekom skladištenja komercijalnih listova zelenog čaja (1 tjedan te 1, 2, 4 i 6 mjeseci) u suhom stanju pri sobnoj temperaturi. Prve statistički značajne gubitke (u prosjeku za oko 30%) uočili su nakon 2 mjeseca čuvanja. Stoga smo se i u ovom istraživanju odlučili promatrati promjene fenolnog sastava osušenih uzoraka listova masline sorte Leccino nakon 2 mjeseca čuvanja pri sobnoj temperaturi.

Rezultati prikazani u Tablici 6. ukazuju na statistički značajne razlike u količini ekstrahiranih fenolnih tvari kod obje vrste otapala i oblika čuvanja biljnog materijala („metanol / mljeveno“ odnosno „voda / rezano“). Kod mljevenog materijala čuvanog dva mjeseca, metanolnom ekstrakcijom dobivena je za 4,5% veća vrijednost ukupnih fenolnih tvari, dok se kod rezanog materijala primjenom vruće vodene ekstrakcije ta vrijednost smanjila za 6,2% u odnosu na početne razine, u oba slučaja statistički značajno. Smanjenju razine ukupnih fenola kod varijante „voda / rezano“ doprinijelo je pet od ukupno 15 identificiranih komponenti, od kojih u najvećoj mjeri glukozidi oleuropein i luteolin-7-*O*-glukozid. Budući da se kod ove varijante uočava porast aglikonskog oblika tj. luteolina te porast ili pojava jednostavnih fenolnih tvari (hidroksitirosol, tirosol, katehin, vanilin, ferulična kiselina), može se pretpostaviti da je tijekom čuvanja te uslijed mljevenja rezanog materijala prije ekstrakcije došlo do hidrolize složenijih fenolnih tvari pod utjecajem endogenih enzima, u prvom redu β -glukozidaze (De Leonardis, *et al.*, 2015.) Ipak, smanjenje razine ukupnih fenola znatno je manje od očekivanog s obzirom na 30%-tno smanjenje koje su u sličnim istraživanjima uočili Friedman i suradnici (2010.) za listove čajevca te Jiménez-Zamora i suradnici (2016.) kod više biljnih vrsta (za list masline od čak 62%). Stoga je porast razine ukupnih fenola kod varijante „metanol / mljeveno“ za 4,5% sasvim neočekivan. Takvom porastu statistički je značajno doprinijelo 9 komponenti, među kojima u najvećoj mjeri oleuropein.

5.4. Fenolni sastav listova masline sorte Leccino ovisi o obliku čuvanja listova prije ekstrakcije

Zanimljivo je istaknuti da pretraživanjem literature nisu pronađena istraživanja ovog aspekta čuvanja biljnog materijala namijenjenog pripremi infuzija. Za listove čajevca Kosińska i Andlauer (2014.) navode samo da su glavni čimbenici koji utječu na kvalitetu tijekom skladištenja svjetlost, kisik i temperatura, a da se stabilnost katehina najbolje može očuvati pri sobnoj temperaturi uz vlažnost zraka ispod 43% ili u zamrzivaču uz vlažnost zraka ispod 60% (Kosińska & Andlauer, 2014.).

Rezultati Tablica 7 i 8 ovog istraživanja pokazuju utječe li oblik čuvanja listova masline sorte Leccino na promjene u sastavu i količini fenolnih tvari čuvanog biljnog materijala. U Tablici 7 (ekstrakcija metanolom) može se uočiti da je udio ukupnih fenolnih tvari bio statistički značajno veći kod cjelovitih listova, i to za 3,7% viši u odnosu na rezani te 3,2% viši u odnosu na mljeveni oblik. Tome je u najvećoj mjeri doprinio veći udio oleanolične kiseline u cjelovitim listovima. Budući da je oleanolična kiselina komponenta oleuropeina koja se iz njega može osloboditi hidrolizom, to može biti povezano s boljom očuvanosti endogenih hidrolitičkih enzima u cjelovitim nego u mljevenim ili rezanim listovima. Između mljevenog i rezanog oblika, kod jednostavnih fenolnih tvari tj. fenolnih alkohola i fenolnih kiselina nije bilo statistički značajnih razlika. Male razlike između mljevenog i rezanog oblika, iako statistički značajne, zabilježene su kod pojedinih složenih komponenti, ali ne i kod oleuropeina kao prevladavajuće fenolne komponente. Stoga između mljevenog i rezanog oblika nije bilo statistički značajnih razlika ni u masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari. U Tablici 8 prikazani su rezultati dobiveni ekstrakcijom vrućom vodom nakon dva mjeseca čuvanog biljnog materijala. Evidentno je da je samo kod jedne komponente (vanilin) postojala statistički značajna razlika: udio u cjelovitom listu bio je za oko 50% manji nego u rezanom. Međutim, budući da je vanilin jedna od najmanje zastupljenih komponenti u sastavu fenolnih tvari lista

masline, u masenom udjelu ukupnih fenolnih tvari dvaju oblika čuvanja biljnog materijala nije bilo statistički značajnih razlika.

5.5. Nutritivne karakteristike vodenih infuzija maslinovog lišća sorte Leccino

Tablica 9 prikazuje sumu masenih koncentracija hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida) u jednoj šalici (200 mL) infuzija maslinovog lišća sorte Leccino ovisno o različitim uvjetima pripreme infuzija. Za djevičanska je maslinova ulja odobrena zdravstvena tvrdnja „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidacijskog stresa“ - ulja moraju sadržavati minimalno 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata u uobičajenoj dnevnoj porciji (20 g ulja) (Provedbena uredba Komisije (EU) br. 492/2012, 2012.). Konzumiranjem jedne šalice infuzije pripremljene od 1,0 g netom osušenog i mljevenog lista u 100 mL vruće vode bilo je moguće unijeti 20 puta više bioaktivnih fenola u odnosu na minimum (5 mg) uz koji se kod djevičanskih maslinovih ulja može isticati odobreni zdravstveni učinak. Ostale tri infuzije bile su pripremane od rezanog lišća, netom osušenog ili dva mjeseca čuvanog u rezanom ili cjelovitom obliku. Kao što je već istaknuto u točki 5.2., ekstrakcija fenolnih tvari iz rezanog materijala višestruko je manje učinkovita od ekstrakcije iz mljevenog materijala. Stoga je kod infuzija dobivenih iz rezanog materijala bilo moguće unijeti manje bioaktivnih fenola konzumiranjem jedne šalice, ali još uvijek 10 do 12 puta više od minimuma za odobrenu zdravstvenu tvrdnju kod djevičanskih maslinovih ulja. Uzimajući to u obzir, listovi maslina namijenjeni pripremi infuzija mogli bi se razmotriti za isticanje slične zdravstvene tvrdnje prilikom stavljanja na tržište.

Drugi nutritivni aspekt koji bi mogao biti zanimljiv kod biljnih infuzija je doprinos unosu elemenata u tragovima. Elementi u tragovima su anorganske tvari u prirodi koje su ljudskom organizmu potrebne u količinama manjim od 100 mg dnevno (Al-Fartusie & Mohssan, 2017.), među kojima smo u Tablici 10 izdvojili željezo, cink i selenij sadržan u jednoj

šalici (200 mL) infuzija masline lista sorte Leccino. Sadržaj ovih triju elemenata je statistički značajno veći u infuzijama dobivenim od rezanih listova u odnosu na mljevene listove. Razlog tomu najvjerojatnije je dvostruko veća masa rezanih listova korištenih za pripremu infuzije (2 g u odnosu na 1 g), bez obzira na to što se iz mljevenih listova očekuje bolja ekstrakcija mineralnih tvari. Najveći doprinos šalice infuzije lista masline preporučenom dnevnom unosu zabilježen je kod cinka (3,5% iz rezanog lista), dok je doprinos u svim ostalim slučajevima i za sva tri razmatrana elementa bio ispod 1%. Suliburska i Kaczmarek (2012.) su u istraživanju minerala u biljnim infuzijama zaključili da se u infuzijama pripremljenim od 2 g biljnog materijala na 100 mL vode ekstrahira najmanje Fe te zanemarive količine Zn i Se te da jedna šalica (200 mL) biljne infuzije nije dovoljna za zadovoljavanje dnevnih potreba tih elemenata u organizmu. Treba istaknuti da je istraživanje Pytlakowske i suradnika (2012.) na infuzijama sedam različitih biljnih vrsta pokazalo da se mineralne tvari ekstrahiraju različitom brzinom te su ih podijelili u tri skupine: visoko ekstraktabilne >55% (K), umjereno ekstraktabilne 20-55% (Mg, Na, P, B, Zn i Cu) te nisko ekstraktabilne <20% (Al, Fe, Mn, Ba, Ca i Sr). To djelomično može objasniti više koncentracije cinka u odnosu na koncentracije željeza i selenija dobivene u ovom istraživanju. Također treba naglasiti da je u našem slučaju vrijeme ekstrakcije od 5 minuta bilo kraće od onog kojeg su Özcan i suradnici (2008.) utvrdili kao optimalno (10 minuta) za ekstrahiranje većine mineralnih tvari iz 19 različitih biljnih vrsta, među kojima ipak nije bilo lista masline. Na temelju navedenog može se zaključiti da su razine željeza, cinka i selenija u listovima masline sorte Leccino preniske da bi se moglo razmišljati o isticanju prehrambenih tvrdnji tipa „izvor određenog minerala“ na eventualnim komercijalnim napicima od lista masline. Naime, prema Uredbi (EZ) br. 1924/2006 o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama na hrani, da bi se takva tvrdnja istaknula na nekom tekućem prehrambenom proizvodu, 200 mL takvog proizvoda trebalo bi zadovoljiti minimalno 15% preporučenog dnevnog unosa određenog minerala.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata i provedene rasprave u ovom radu, za listove masline sorte Leccino proizlaze sljedeći zaključci:

- 1.) Postupak ekstrakcije metanolom netom osušenih listova statistički je značajno učinkovitiji u ekstrakciji većine identificiranih fenolnih komponenti iz mljevenog lista od postupka s vrućom vodom (za oko 33%).
- 2.) Kod ekstrakcije vrućom vodom, stupanj usitnjenosti netom osušenih listova značajno doprinosi količini ukupnih ekstrahiranih fenola - iz mljevenog oblika oko 4 puta više nego iz rezanog oblika, dok nakon dvomjesečnog čuvanja osušenih listova uglavnom nema statistički značajnih razlika između stupnjeva usitnjenosti.
- 3.) Kod ekstrakcije metanolom, stupanj usitnjenosti osušenih listova čuvanih dva mjeseca blago ali značajno utječe na udio ekstrahiranih fenolnih tvari - iz čuvanih cjelovitih pa rezanih listova ekstrahira se za 3,7% više u odnosu na čuvani rezani oblik te za 3,2% više u odnosu na čuvani mljeveni oblik.
- 4.) Uslijed dvomjesečnog čuvanja osušenog biljnog materijala, u odnosu na početne vrijednosti javljaju se blage ali značajne varijacije mase ekstrahiranih fenolnih tvari - smanjenje za 6% kod ekstrakcije vrućom vodom, odnosno povećanje za 4% kod ekstrakcije metanolom.
- 5.) Jednom šalicom infuzija lista masline moguće je unijeti 10 do 20 puta više fenolnih tvari od minimuma za koji je kod djevičanskih maslinovih ulja odobrena zdravstvena tvrdnja o doprinosu zaštiti lipida u krvi od oksidacijskog stresa.
- 6.) Jedna šalica infuzije lista masline ne predstavlja značajan izvor željeza, cinka i selenija, budući da uglavnom sadrži manje od 1% preporučenog dnevnog unosa za ove elemente.

7. LITERATURA

1. Al-Fartusie, F. S. i Mohssan, S. N., 2017.. Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 5(3), pp. 127-136.
2. Basuny, A. M. i Arafat, S. M., 2018.. Olive Leaves Healthy Alternative for Geen Tea. *Current Trends in Biomedical Engeenering i Biosciences*, 14(3), p. 555889.
3. British Nutrition Foundation, 2009. *Minerals and trace elements*. [Mrežno] Available at: https://www.nutrition.org.uk/nutritionscience/nutrients-food-and-ingredients/minerals-and-trace-elements.html?showall=1ilimitstart=i_cf_chl_jschl_tk_=7be56476bbfb02dd4c944d43c2458ddc39a03dcf-1591014205-0-ASLSEjVxitam6h3nwlaqBfc1WQc4VoMtRxB3DKfLN_VRB9JnA [Pokušaj pristupa 2020.].
4. Calabrese, G., Tartaglini, N. i Ladisa, G., 2012.. The origin and distribution of olive tree and olive crop. U: *Study on biodiversity in century-old olive groves*. Bari: Ciheam-Iamb., pp. 1-2.
5. Casazza, A., Aliakbarian, B., Comotto, M. i Monteiro, S., 2017. Olive Leaves Infuse and Decoct Production: Influence of Leaves Drying Conditions and Particle Size. *Chemical Engineering Transactions*, Volume 57, pp. 1807-1812.
6. Cimato, A. i Attilio, C., 2011. Worldwide diffusion and relevance of olive culture. U: L. Schena, G. Agosteo i S. Cacciola, ur. *Olive Diseases and Disorders*. Italy: Transworld Research NetWork.

7. da Silva Pinto, M., 2013.. Tea: A new perspective on health benefits. *Food Research International*, 53(2), pp. 558-567.
8. De Leonardis, A., Macciola, V., Cuomo, F. i Lopez, F., 2015.. Evidence of oleuropein degradation by olive leaf protein extract. *Food Chemistry*, Svezak 175, pp. 568-574.
9. Dent, M. i dr., 2013.. Polyphenols from Dalmatian Wild Sage. *Food Technol. Biotechnol.*, 51(1), p. 84–91.
10. Dmowski, P., Śmiechowska, M. i Sagan, E., 2014.. Effect of brewing time and fragmentation degree of black tea on colour of infusion and its antioxidant properties. *The Scientific Organ of Polish Food Technologists' Society*, 21(96), p. 206 – 216.
11. Državni zavod za statistiku, 2020.. Proizvodnja povrća, voća i grožđa 2019. – privremeni podaci. *EU 432/2012.*
12. Ferdousi, F., Araki, R., Hashimoto, K. i Isoda, H., 2018.. Olive leaf tea may have hematological health benefit over green tea. *Clinical Nutrition*, 38(6), pp. 2952-2955.
13. Friedman, M., Levin, C., Lee, S. i Kozukue, N., 2009.. Stability of Green Tea Catechins in Commercial Tea Leaves during Storage for 6 Months. *The Society for Food Science and Technology*, 74(2), pp. 47-51.
14. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. i Ra, A., 2011.. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), pp. 1147-1154.
15. Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y. i Ghan, J., 2019.. Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, Svezak 23, p. e00347.

16. Horžić, D. i dr., 2008.. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, Volume 115, p. 441–448.
17. Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C. i Rufián-Henares, J. A., 2016.. Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry*, Svezak 199, p. 339–346.
18. Kadoić, A., 2015.. Biodostupnost i zaštitni učinci polifenola. *Diplomski rad*, pp. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
19. Kailis, S. i Harris, D., 2007.. Producing Table Olives. U: Australia: Landlinks Press, pp. 8-9, 27, 30.
20. Kopjar, M., Tadić, M. i Piližota, V., 2015.. Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2(1).
21. Kosińska, A. i Andlauer, W., 2014.. Antioxidant Capacity of Tea: Effect of Processing and Storage. U: *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. s.l.:an., pp. 109-112.
22. Kovačić, I., Bilić, J., Dudaš, S. i Poljuha, D., 2017. Phenolic content and antioxidant capacity of istrian olive leaf infusions. *Poljoprivreda/Agriculture* , 23(2), pp. 38-45.
23. Ma, X. i dr., 2018.. Phenolic compounds and antioxidant activities of tea-type infusions processed from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) leaves. *Food Chemistry*, Svezak 272, pp. 1-11.

24. Medina, E., Romero, C., García, P. i Brenes, M., 2019.. Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusion. *Food i function*, 10(8), pp. 4716-4724.
25. Mujić, I. i dr., 2011.. Phenolic compounds in olive leaf extract as a source of useful antioxidants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 6(3-4), pp. 129-133.
26. Musa Özcan, M., Ünver, A., Uçar, T. i Arslan, D., 2008.. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chemistry*, 106(3), pp. 1120-1127.
27. Nookabkaew, S., Rangkadilok, N. i Satayavivad, J., 2006.. Determination of Trace Elements in Herbal Tea Products and Their Infusions Consumed In Thailand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), pp. 6939-6944.
28. Peršurić, Ž., Saftić, L., Klisović, D. i Kraljević Pavelić, S., 2018.. Polyphenol-Based Design of Functional Olive Leaf Infusion. *Food Technology and Biotechnology*, 57(2), pp. 171-182.
29. Previšić, I., 2019.. Utjecaj temperature pripreme na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet infuzija maslinovog lišća autohtonih sorti. *Diplomski rad*, Medicinski fakultet Sveučilšta u Rijeci.
30. Provedbena uredba Komisije (EU) br. 492/2012, 2012.. Provedbena uredba Komisije (EU) br. 492/2012 od 7. lipnja 2012. o odobrenju izmjena koje nisu manje specifikacije za naziv upisan u Registar zaštićenih oznaka izvornosti i zaštićenih oznaka zemljopisnog podrijetla (Berenjena de Almagro (ZOZP)). *Posebno izdanje na hrvatskom jeziku: Poglavlje 15, Svezak 021*, pp. 42-43.

31. Pytlakowska, K. i dr., 2012.. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chemistry*, Svezak 135, pp. 494-501.
32. Suliburska, J. i Kaczmarek, K., 2012.. Herbal infusions as a source of calcium, magnesium, iron, zinc, and copper in human nutrition. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(2), pp. 194-198.
33. 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.
34. Tapiero, H. i Tew, K. D., 2003.. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine i pharmacotherapy = Biomedecine i pharmacotherapie*, 57(9), pp. 399-411.
35. Theuma, M. i Attard, E., 2020.. From herbal substance to infusion: The fate of polyphenols and trace elements. *Journal of Herbal Medicine*, Svezak 21, p. 100347.
36. Uredba (EZ) br. 1924/2006 , 2006.. Uredba (EZ) br. 1924/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 20. prosinca 2006. o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama koje se navode na hrani. *Posebno izdanje na hrvatskom jeziku: Poglavlje 15*, Svezak 007, pp. 172 - 187.
37. Vlak, P., 2019.. *Selen: Uloga u organizmu i posljedice nedostatka*. [Mrežno] Available at: https://vitamini.hr/dodaci-prehrani_1/selen-1672/ [Pokušaj pristupa 2020.].
38. Wang, L. F., Kim, D. M. i Lee, C. Y., 2000.. Effects of Heat Processing and Storage on Flavanols and Sensory Qualities of Green Tea Beverage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), pp. 4227-4232.

Životopis

Ivana Tokić, rođena je 31. svibnja 1996. godine u Livnu, BiH. Pohađala je Osnovnu školu "13. Rujan", te nakon toga Opću gimnaziju "Nikola Šop" u Jajcu. Nakon završene srednje škole seli se u Zagreb te tamo završava preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom veleučilištu i stječe titulu stručne prvostupnice sanitarnog inženjerstva. Svoje obrazovanje nastavlja na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na Diplomskom sveučilišnom studiju sanitarnog inženjerstva.

Popis tablica

Tablica 1. Hipoteze i dizajn pokusa	11
Tablica 2. Promjena sastava mobilne faze tijekom gradijentnog eluiranja	17
Tablica 3. Valne duljine UV-VIS detekcije fenolnih spojeva	18
Tablica 4. Maseni udio ¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o otapalu i uvjetima ekstrakcije	21
Tablica 5. Maseni udio ¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o usitnjenosti biljnog materijala i uvjetima ekstrakcije	22
Tablica 6. Maseni udio ¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o čuvanju biljnog materijala prije ekstrakcije.....	23
Tablica 7. Maseni udio ¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o obliku čuvanja biljnog materijala (ekstrakcija metanolom nakon 2 mjeseca čuvanja ²)	24
Tablica 8. Maseni udio ¹ fenolnih tvari u listu masline sorte Leccino (mg/kg suhe tvari lista) ovisno o obliku čuvanja biljnog materijala (ekstrakcija vodom nakon 2 mjeseca čuvanja)	25
Tablica 9. Masene koncentracije ¹ hidroksitirosola i njegovih derivata (oleuropeina i verbaskozida u infuzijama sorte Leccino pri različitim uvjetima pripreme, s usporedbom prema minimalnom unosu za postizanje zdravstvenog učinka	26
Tablica 10. Mase ¹ Fe, Zn, Se sadržane u jednoj šalici (200 mL) infuzija lista masline sorte Leccino, s udjelom doprinosa preporučenom dnevnom unosu ² (PDU)	27

Popis slika

Slika 1. Fenolni spojevi sadržani u listovima masline.....	4
Slika 2. Prikaz osušenih listova masline sorte Leccino	12