Određivanje sadržaja polifenola u ekstraktima lista masline

Sačer, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:222806

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Sačer

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Sačer

ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

prof. dr. sc. Aleksandra Sander

prof. dr. sc. Vesna Tomašić

Zagreb, rujan 2020.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na prilici da učim i radim pod njezinim mentorstvom, velikoj pomoći, stručnim savjetima te strpljenju prilikom pisanja ovog rada.

Također, veliko hvala i asistentici Anamariji Mitar, mag. ing. cheming., na uloženom trudu, strpljenju i prijateljskom pristupu prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima, Dubravki i Damiru, jer su mi pružili mogućnost studiranja te vjerovali u mene i moj uspjeh kad ni sama nisam.

Hvala i mojoj sestri Nikolini i Domagoju te svima ostalima koji su mi svojom potporom, savjetima i ukazanoj ljubavi olakšali studiranje i uvijek bili uz mene.

Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

Istraživanja su provedena na Zavodu za mehaničko i procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije te na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u akademskoj godini 2019/2020.

SAŽETAK

ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE

List masline jedan je od nusprodukata maslinarstva koji se akumulira tijekom obrezivanja stabala masline. Masline su prisutne najčešće u Mediteranskim zemljama koje klimatski pogoduju njihovom uzgoju. Lišće masline sadrži znatne koncentracije polifenolnih spojeva koji se izdvajaju i primjenjuju u prehrambenoj, farmaceutskoj te kozmetičkoj industriji. Polifenolnim spojevima pripisuju se mnoge zdravstvene pogodnosti te se upravo zbog toga ekstrakti lišća maslina koriste u liječenju dijabetesa, hipertenzije, bolesti želuca, astme i mnogih drugih bolesti. U kozmetičkoj industriji, ekstrakti lišća maslina koriste se u proizvodima za zaštitu od sunca, anti-age kremama te pripravcima za smanjenje hrapavosti kože i povećanje hidratacije i elastičnosti kože. Najčešće primjenjivana separacijska metoda izdvajanja polifenola iz lišća maslina je ekstrakcija čvrsto-kapljevito.

U ovom radu ispitana su različita otapala za ekstrakciju polifenola iz lišća masline. Određene su koncentracije ukupnih polifenola i oleuropelina, polifenolnog spoja koji je prema literaturi najzastupljeniji u listu masline. Koncentracije ukupnih polifenola određene su pomoću UV spektrofotometra, a koncentracija oleuropeina pomoću HPLC uređaja. Ispitana je i mikrobiološka aktivnost ekstrakta kako bi se utvrdilo da li je ekstrakt pogodan za daljnju primjenu u kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: lišće masline, ekstrakcija, polifenolni spojevi, oleuropein, polipropilen glikol, mliječna kiselina

SUMARY

DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN OLIVE LEAF EXTRACTS

Olive leaf is one of the by-products in olive growing which is accumulated during the pruning of olive trees. Olives are growing in Mediterranean countries due to the suitable climate. Olive leaf contains a significant concentration of polyphenolic compounds which, if separated, can be used in the food industry, pharmacy and cosmetic industry.

Polyphenolic compounds are known as health-beneficial and for that reason olive leaf extract is used in diabetes treatment, hypertension, stomach diseases, asthma and many other diseases. In the cosmetic industry olive leaf extract is used in sun protection products and anti-aging creams. What's more, it improves skin condition by diminishing skin roughness and increasing skin hydration and elasticity.

Most commonly used separation method of polyphenolic compounds from olive leaf is solvent-liquid extraction.

This study examines different solvents for extraction of polyphenolic compounds. The study found a certain concentration of total phenolic compound and oleuropein, phenolic compound which is most common in olive leaf extract. The concentration of total phenolic compound is determined using UV spectropfotometer, while the concentration of oleuropein is determined using HPLC device. Finally, study examines microbiological activity of the extract with a goal to determine whether the extract was suitable for further use in the cosmetic industry.

Key words: olive leaf, extraction, polyphenolic compounds, oleuropin, polypropylene glycol, lactic acid

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. MASLINA 2
2.2. FENOLNI SPOJEVI 4
2.2.1. Prednosti i primjena fenolnih spojeva[12] 4
2.2.2. Fenolni spojevi u listu masline 6
2.2.3. Metode izdvajanje polifenola 7
2.3. EKSTRAKCIJA 9
2.3.1. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito 9
2.3.2. Izbor otapala 11
2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE 13
2.4.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline 13
2.4.2. Određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima lista masline 14
3. METODIKA 16
3.1. SVRHA RADA 16
3.2. POPIS KORIŠTENIH KEMIKALIJA 16
3.3. LIST MASLINE 16
3.3.1. Priprema lista masline 16
3.3.2. Uzimanje reprezentativnog uzorka 17
3.3.3. Raspodjela veličina čestica lista masline 18
3.3.4. Određivanje prave gustoće lista masline 19
3.4. EKSTRAKCIJA 21
3.4.1. Odabir otapala 21
3.4.2. Fourierova pretvorna infracrvena spektroskopija 24
3.4.3. Određivanje fizikalnih svojstava otapala 24
3.4.4. Provedba ekstrakcije 26
3.4.5. Filtracija uzorka 27
3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE 28
3.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline 28
3.5.2. Određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima lista masline 30
3.6. MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST 31
4. REZULTATI I RASPRAVA 32
4.1. LIST MASLINE 32

4.1.1. Raspodjela veličina čestica 32
4.1.2. Određivanje prave gustoće lišća masline 32
4.2. EKSTRAKCIJA 33
4.2.1. Odabir otapala 33
4.2.2. Fizikalna svojstva otapala 35
4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE 38
4.3.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline 38
4.3.2. Određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima lista masline 39
4.4. MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST 41
5. ZAKLJUČAK 42
6. POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA 43
7. LITERATURA 45
8. ŽIVOTOPIS 47

1. UVOD

Maslina, biljka od velikog značaja Mediteranskog podneblja, pokazala se kao vrijedan izvor mnogih bioaktivnih komponenti koje imaju pogodan učinak na ljudsko zdravlje, te ujedno kao tema brojnih istraživanja. List masline jedan je od nusprodukata maslinarstva koji se akumulira tijekom obrezivanja stabala maslina. Povijesno gledano, list masline koristio se kao narodni lijek u borbi protiv groznice i malarije. Nekoliko istraživanja pokazalo je da ekstrakt lista masline ima sposobnost snižavanja krvnog tlaka u životinja, povećava protok krvi u koronarnim arterijama, ublažava aritmiju i sprječava grčenje crijevnih mišića.[1] Štoviše, nedavna eksperimentalna i teorijska istraživanja otkrila su da ekstrakt lišća masline blokira ulazak HIV virusa u stanice domaćina.[2] Navedene zdravstvene pogodnosti posljedice su postojanja velikog broja polifenolnih spojeva različite prirode i strukture u lišću masline. Neka istraživanja pokazuju prisutnost 1-12% fenolnih spojeva u lišću masline, dok je postotak u maslinovom ulju znatno niži i iznosi 0,005-0,12% polifenola.

Polifenolni spojevi koriste se u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te potencijalno, kod obnove energije i obrade otpadnih voda. U kozmetičkoj industriji najviše se koriste kod zaštite od UV zračenja te u sredstvima protiv starenja kože.

Jedan od glavnih fenolnih spojeva prisutan u listu masline je oleuropein. Slijede ga hidroksitirazol, luterin-7-glikozid, apigenin-7-glukozid i verbaskozid.

Oleuropein je gorki spoj iz porodice sekoiridoida. Otkrili su ga Bourquelot i Vintilesco 1908. godine, a karakteriziraju ga protuupalna svojstva. Djeluje antimikrobno protiv virusa, retrovirusa, bakterija, kvasci, gljivica, plijesni i drugih parazita.[1]

Kako bi se vrijedni polifenolni spojevi izdvojili iz lista masline, najčešće se provodi separacijski proces ekstrakcije čvrsto-kapljevito. Važan korak prije ekstrakcije uzorka je izbor otapala. Najčešće korištena organska otapala sve se više zamjenjuju ionskim kapljevinama te alternativama iz zelene kemije, niskotemperaturnim eutektičnim otapalima.

U ovom radu, određuje se sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline Folin-Ciocalteu metodom, dok se sadržaj sekoiridoida oleuropeina mjeri na HPLC uređaju. Određuje se i mikrobiološka aktivnost ekstrakata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLINA

Maslina je vrlo stara biljna vrsta čija stabla su kultivirana i posađena prije 5 do 6 tisuća godina na područja Mezopotamije, Sirije i Palestina. Iz tih područja, maslina se proširila Mediteranom, gdje se danas i najviše uzgaja. U Hrvatskoj se maslina uzgaja duž cijelog priobalja, od Istre do juga Dalmacije, uključujući i otoke.[3] Masline i maslinovo ulje karakteristične su sastavnice mediteranske prehrane i smatraju se jednim od faktora odgovornim za nisku učestalost kroničnih srčanih bolesti i karcinoma prostate, dojke i debelog crijeva na ovom području.[4]

Maslina je zimzelena biljka koja može doseći visinu do 10 m, dok promjer debla doseže do 1 m. Listovi su mali, duguljasti, svijetlozeleni, kožasti, dok plod uslijed sazrijevanja mijenja boju iz zelene u ljubičastu, gotovo crnu boju. Pri promjeni boje, gubi se gorčina i povećava se sadržaj ulja. Zeleni plodovi beru se za jelo, a preradom zrelih, ljubičastih plodova dobiva se maslinovo ulje.[5] Plodovi i listovi masline, kao i maslinovo ulje, prikazani su na slici 1.



a) b)

Slika 1. a) Plodovi i listovi masline, b) maslinovo ulje.

Plodovi masline nakon dopremanja u uljaru prolaze kroz proces čišćenja i pranja te mljevenja. Nakon miješanja slijedi ekstrakcija ulja, koja se temelji na jednom od tri principa, prešanju, centrifugiranju ili selektivnoj filtraciji. Preradom maslina nastaju velike količine tekućeg i krutog otpada, odnosno nastaje otpadna voda te komina masline, koja predstavlja veliki ekološki problem u sredozemnim zemljama Europe.[5]

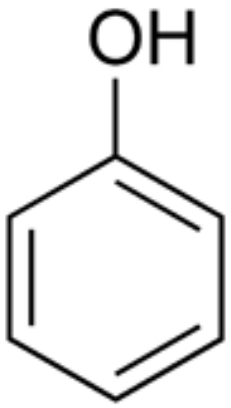
List masline jedan je od nusprodukata maslinarstva koji se akumulira tijekom obrezivanja stabala maslina. List masline koristi se u tradicionalnoj medicini. Poznato je da smanjuje šećer u krvi, kolesterol i mokraćnu kiselinu. Također se koristi za liječenje dijabetesa, hipertenzije,

upale, proljeva, infekcija dišnih i mokraćnih putova, bolesti želuca i crijeva, astme, hemoroida, reumatizma.[6] Nedavna istraživanja pokazala su i njegov antikancerogeni, protuupalni, hipoglikemijski, antimikrobni, antivirusni te antitrombotski učinak. Ove zdravstvene pogodnosti posljedice su postojanja velikog broja fenolnih spojeva različite prirode i strukture u listovima masline.[7] Kao agrikulturni i industrijski otpad, listovi masline su jeftin, obnovljiv i obilan izvor polifenola.[8]

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi najveća su skupina fitokemikalija. Prisutni su u gotovo svim biljkama kao sekundarni metaboliti te imaju važnu ulogu u procesima rasta i razmnožavanja biljke. Pružaju biljkama zaštitu od patogena i grabežljivaca.[9]

Fenolni spojevi su organski spojevi koji se sastoje od jedne ili više hidroksidnih skupina (-OH) izravno vezanih na aromatski prsten. Najjednostavniji takav spoj je fenol, čija je struktura prikazana na slici 2.[10]



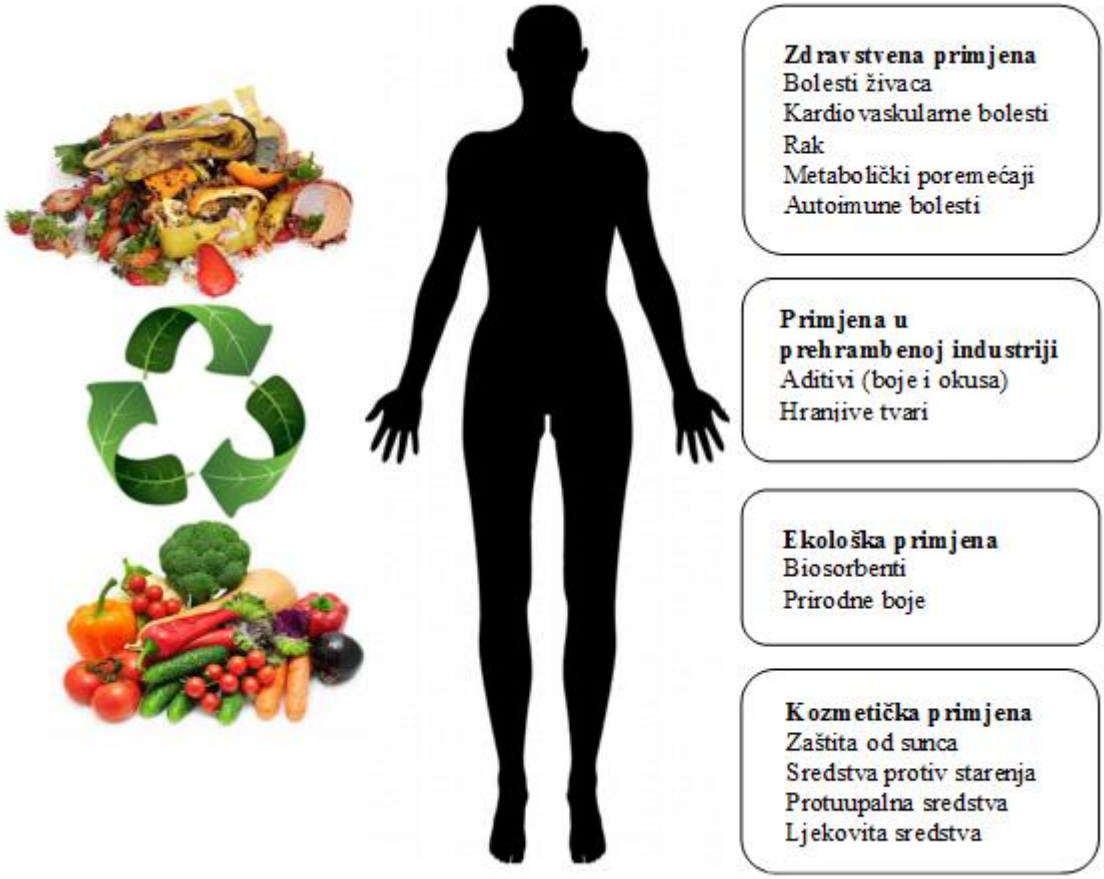
Slika 2. Prikaz formule fenola.

Polifenolni spojevi uključuju fenolne kiseline i flavonoide. Flavonoidi obuhvaćaju najširu polifenolnu skupinu koja se sastoji od brojnih podgrupa, dok se fenolne kiseline sastoje od fenolnog prstena i karboksilne kiseline.[11]

2.2.1. Prednosti i primjena fenolnih spojeva[12]

Fenolnim spojevima pripisuju se brojne zdravstvene prednosti koje proizlaze iz njihovih antialergijskih, pretuupalnih, antimikrobnih, antioksidativnih, antitrombotskih i kardioprotektivnih svojstava. Iako su prisutni u gotovo svim biljnim namirnicama, fenoli u ljudskoj prehrani uglavnom dolaze iz voća, povrća i pića. Fenoli su također prisutni i u biljnom otpadu kao što su pulpa od grožđa, kora i sjemenke voća i ostatci drveća koji bi se mogli koristiti kao izvor polifenola za ponovno ubacivanje u prehrambeni lanac. Polifenoli dobiveni iz biljaka u posljednje vrijeme dobivaju sve veću pažnju kao zamjena za sintetičke antioksidanse poput butilnog hidroksianizola, butilnog hidroksitoluena i tetrabutil hidrokinona koji se široko koriste u prehrambenoj industriji. Polifenolni spojevi koriste se i u farmaceutskoj i kozmetičkoj

industriji te potencijalno, za posebne svrhe kao što su obnova energije i obrada otpadnih voda. Neke primjene polifenolnih spojeva prikazane su na ilustraciji na slici 3.



Slika 3. Primjena polifenolnih spojeva[12].

Potrošači u kozmetičkoj industriji sve više traže inovacije prirodnih spojeva u liječenju starenja kože poput bora i hiperpigmentacije. Kao odgovor, proizvođači pokreću organske linije proizvoda za liječenje problema i bolesti kože, a rješenje nalaze u proizvodnji polifenola ekstrahiranih iz prehrambenih nusprodukata.

Neke blagodati polifenolnih spojeva istražene su i opisane u literaturi. Jedna studija na antocijaninu iz ljubičastog slatkog krumpira istraživala je mogućnost apsorpcije uzorka u dermatološke svrhe. U koncentraciji od 0,61mg/100g kreme, antocijanini su apsorbirali 46% UV zračenja, što dovodi do zaključka da su ti spojevi učinkoviti za primjenu u proizvodima za sprječavanje oštećenja kože. Također, polifenolni spojevi koriste se u pripravcima za oporavak rana, anti-age kremama te oralnim pripravcima za smanjenje hrapavosti kože i povećanje hidratacije i elastičnosti kože.

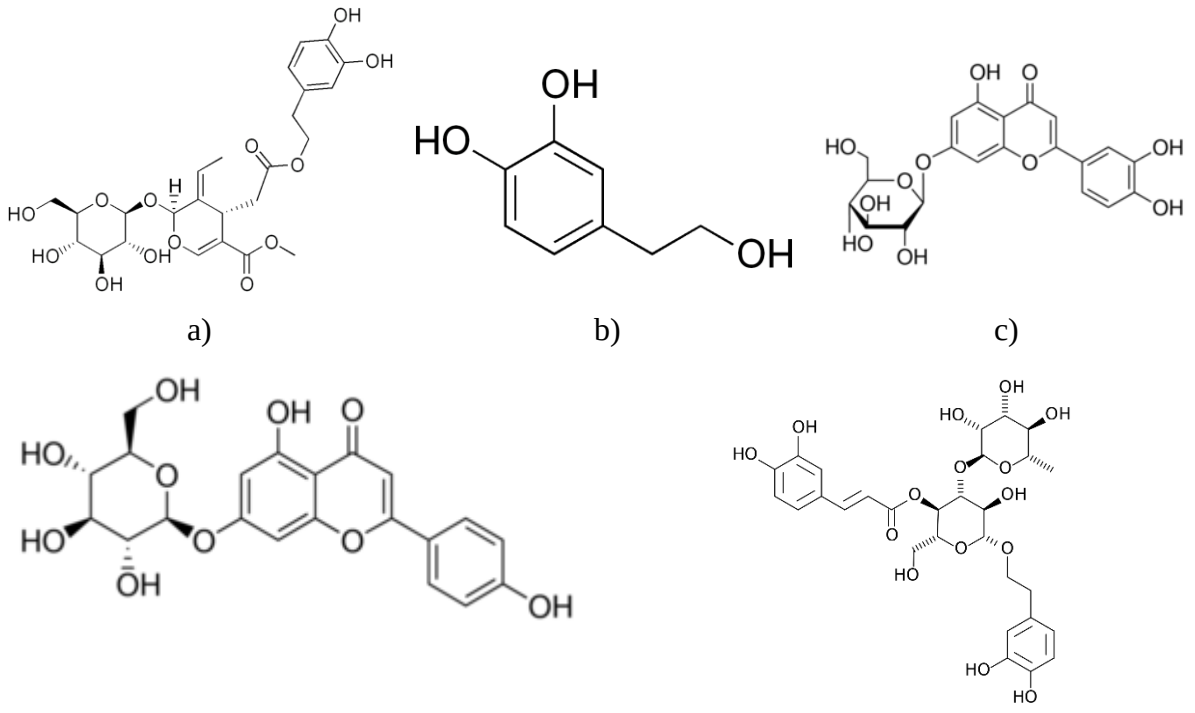
2.2.2. Fenolni spojevi u listu masline

Ovisno o razvoju i zrenju biljke, fenolni spojevi u plodu i listu masline variraju količinom i vrstom. Jedan od glavnih fenolnih spojeva u nezrelim maslinama je sekoiridoid oleuropein. Maslinovo ulje najpoznatiji je proizvod masline te se obilno koristi u mediteranskoj prehrani, no ono ne sadrži toliku koncentraciju fenola kao list masline. U maslinovu ulju nalazi se tek 0,005-0,12% fenola, dok je u listu ta vrijednost znatno veća i iznosi 1-14%.[13]

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

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

Oleuropein je prisutan u najvećoj koncentraciji, a slijede ga hidroksitirozol, luteolin-7-glukozidi, apigenin-7-glukozidi i verbaskozidi.[13] Strukture navedenih spojeva nalaze se na slici 4.



Slika 4. Kemijske strukture polifenola: a) oleuropein, b) hidroksitirozol, c) luteolin-7-glukozid, d) apigenin-7-glukozid, e) verbaskozid.

Koncentracija polifenolnih spojeva u listu masline mijenja se ovisno o kvaliteti, podrijetlu i raznolikosti biljnog materijala.[2]

2.2.3. Metode izdvajanje polifenola

Prije ekstrakcije polifenola, uzorci koji sadrže ove spojeve moraju se prikupiti i pripremiti na odgovarajući način. Podrazumijeva se da prikupljeni uzorci (biljke, hrana, biološka tekućina) moraju predstavljati reprezentativni uzorak. Treba biti pažljiv pri rukovanju uzorkom kako bi se smanjio gubitak važnih spojeva tijekom transporta uzorka. Kako bi se izbjegla razgradnja polifenola, uzorci se često suše, smrzavaju ili liofiliziraju prije ekstrakcije jer visoka vlaga ili sadržaj vode pomažu enzimskim aktivnostima.[14]

Najčešće primjenjivane tehnike ekstrakcije polifenolnih spojeva su ekstrakcija kapljevito-kapljevito te ekstrakcija čvrsto-kapljevito, ovisno o izvoru polifenola. Koriste se uglavnom organska otapala, poput acetona i etil acetata ili alkilnih alkohola poput metanola, etanola, propanola ili njihovih smjesa. Iako organska otapala imaju izvrsnu sposobnost otapanja i

ekstrakcije polifenola, pokazuju i neke nedostatke poput hlapljivosti, zapaljivosti, velike toksičnosti, nerazgradivost i visoke cijene.[9] Iz tih razloga se traže alternative u zelenoj kemiji.

Iako se u nekim literaturama spominje adsorpcija kao tehnika razdvajanja s malim troškovima, ekstrakcija otapalima je povoljniji proces jer omogućava toplinsko osjetljivim materijalima oporavak na niskim temperaturama. Iz tog razloga se ekstrakcija preporuča za proizvodnju produkata bogatih polifenolima iz biljaka koji se dalje upotrebljavaju u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.[2]

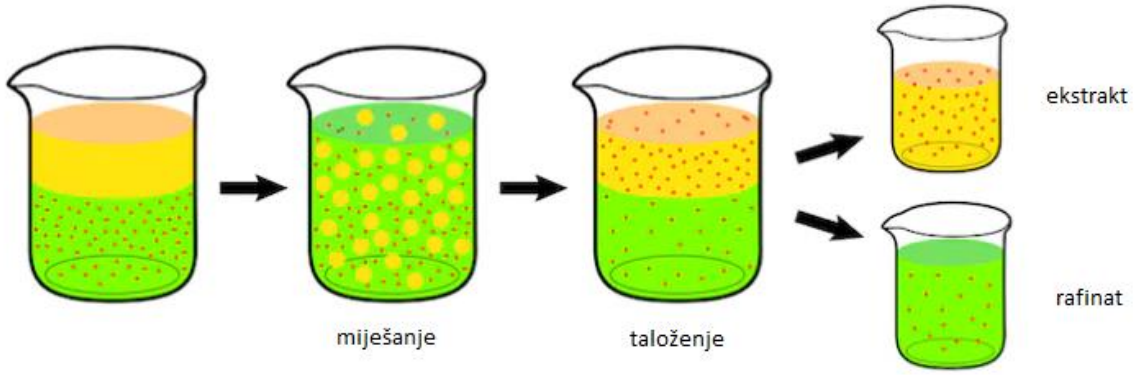
Za izdvajanje polifenola iz lista masline, u literaturi se navode i tehnike poput ultrazvučne ekstrakcije, mikrovalne ekstrakcije, Soxhlet ekstrakcije te ekstrakcije kod visokih tlakova.[11, 15]

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je ravnotežni separacijski proces uklanjanja jedne ili više komponenti iz čvrste ili kapljevite smjese pomoću selektivnog otapala. Razlikuju se dvije vrste ekstrakcije:

- Ekstrakcija kapljevina – kapaljevina
- Ekstrakcija čvrsto - kapljevina; izluživanje

Kod kapljevinske ekstrakcije, selektivno otapalo i određena količina otopljene komponente naziva se ekstrakt. Ekstrakt na ulazu ne sadrži ili sadrži malu količinu komponente koja se uklanja iz primarnog otapala, dok je na izlazu obogaćen otopljenom komponentom. Primarno otapalo ili rafinat i ključna komponenta koju je potrebno ukloniti iz rafinata čine pojnu smjesu. Rafinat na ulazu sadrži veću količinu ključne komponente, a na izlazu je ključna komponente u potpunosti ili djelomično uklonjena.[16] Shema kapljevinske ekstrakcije prikazana je na slici 5.



Slika 5. Proces kapljevinske ekstrakcije.

2.3.1. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito

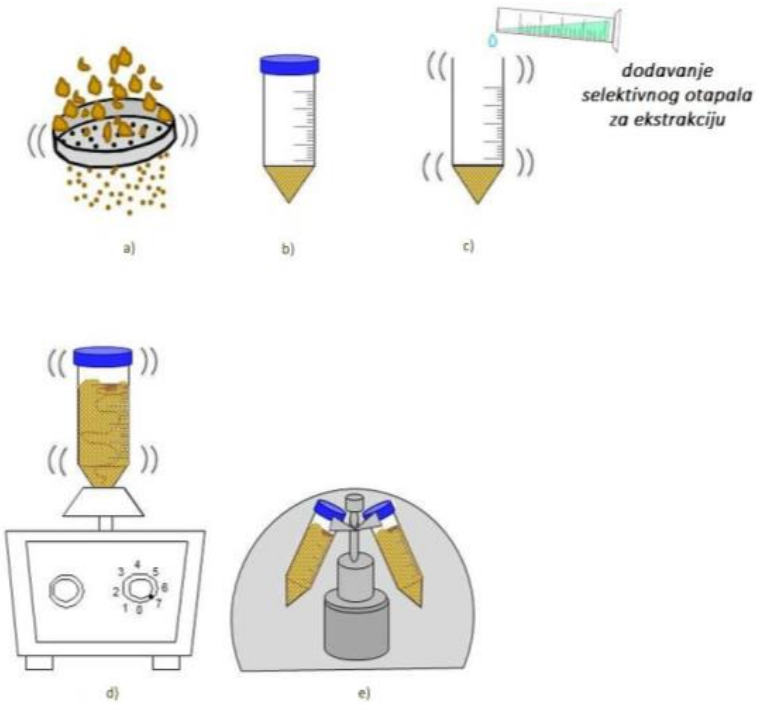
Ekstrakcija čvrsto-kapljevito je operacija prijenosa tvari kojom se jedna ili više komponenti izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog otapala.

Za vrijeme ekstrakcije odvija se prijenos tvari između faza, tj. otopljene tvari prelaze iz čvrstog u otapalo. Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o različitim čimbenicima poput topljivosti komponente u otapalu, temperature ekstrakcije, površine čvrstog koja je u kontaktu s otapalom, viskoznosti otapala i masenom odnosu čvrsto-otapalo. Zbog poboljšanja fizikalnih svojstava kapljevine te poboljšanja prijenosa tvari pogodno je provoditi ekstrakcije pri višim temperaturama što ubrzava proces ekstrakcije. Do poboljšanja prijenosa tvari dolazi zbog povećanja brzine otapanja komponente, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala.

Ipak, temperature rijetko prolaze 100°C jer tada uglavnom dolazi do oštećenja djelatne tvari ili ekstrakcije neželjenih komponenti. Budući da je brzina prijenosa tvari direktno proporcionalna površini prijenosa tvari, čvrstu tvar je prije ekstrakcije potrebno usitniti te homogenizirati. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći sloj krutih čestica. Veći protok otapala povezan je s većom brzinom, a veća brzina daje veće vrijednosti Reynoldsovog broja, što dovodi do smanjenja debljine hidrodinamičkog graničnog sloj između koncentrirane otopine i površine čestica, odnosno difuzijskog sloja, te se time poboljšava ekstrakciju.[17]

Ekstrakcija čvrsto-kapljevito provodi se u sljedećim koracima:

- Priprema krutine – gnječenje, mrvljenje, usitnjavanje, homogeniziranje
- Priprema i doziranje selektivnog otapala,
- Dodavanje selektivnog otapala,
- Miješanje otapala i čvrstog – na mehaničkom miješalu, u tresilici, potpomognuto ultrazvučnim ili mikrovalnim zračenjem,
- Razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka uzorka, taloženje, centrifugiranje, filtracija,
- Uklanjanje otapala iz ekstrakta.



Slika 6. Koraci pri provođenju ekstrakcije čvrsto-kapljevito.

2.3.2. Izbor otapala

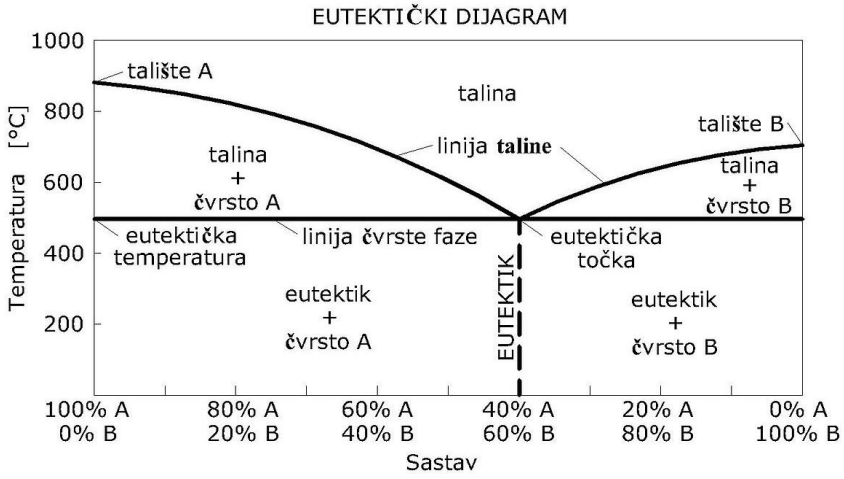
Bilo da se radi o ekstrakciji iz kapljevite ili iz čvrste faze, otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:[16, 18]

- Otapalo mora biti selektivno („slično se otapa u sličnom“);
- Otapalo mora biti učinkovito radi utroška što manje količine otapala;
- Otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima;
- Tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu;
- Otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo se moraju, što je moguće više, razlikovati u gustoći;
- Otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti;
- Otapalo mora imati malu viskoznost i nizak tlak para te odgovarajuću površinsku napetost;
- Otapalo ne smije biti zapaljivo i otrovno;
- Otapalo mora biti toplinski i kemijski stabilno;
- Otapalo mora biti jeftino i ekološki prihvatljivo.

Kao što je već ranije rečeno, kod ekstrakcije čvrsto-kapljevito uglavnom se koriste organska otapala kao heksan, etil acetat, kloroform, aceton, metanol. Zbog njihovih negativnih učinaka na atmosferu, velike toksičnosti, teške razgradivosti i visokih troškova, traže se alternativne metode izdvajanja djelatne tvari. Superkritični fluidi, uglavnom CO_2 i voda, mogu se koristiti kao otapalo, ali njihov ograničeni raspon topljivosti molekula, velika intrinzična reaktivnost, visoka cijena opreme za postizanje superkritičnih uvjeta i čiste vode (posebno ukoliko dođe do kontaminacije, što otežava pročišćavanje vode) ne nudi stvarne izglede za budućnost. Otapala koja potječu iz biomase, kao što su etanol, limonen, etil-laktat, glicerol ili 2-metiltetrahidrofuran, mogu se također koristiti kao alternativa. Oni su bioobnovljivi, neškodljivi i nisu jako skupi, ali su im svojstva otapanja prilično ograničena. Ionske kapljevine (IL) pokazuju neobična svojstva otapala. One se sastoje od veze između organskog aniona i koordiniranog kationa. Imaju vrlo niski tlak pare, nisu zapaljive i stabilne su na visokim temperaturama (oko 200°C). Unatoč tim prednostima, imaju i mane kao što su visoka cijena, visoka toksičnost, poteškoće u pročišćavanju i loša biorazgradivost.[7, 9]

Posljednjih nekoliko godina razvijale su se i istraživale nove vrste otapala nazvane niskotemperaturna eutektička otapala (DES – *deep eutectic solvents*). DES je smjesa dviju ili

više tvari u takvom omjeru u kojem nastala smjesa ima nižu temperaturu taljenja od pojedinačnih komponenti. Fazne promjene nekog sustava grafički se prikazuju ravnotežnim dijagramom stanja, pri atmosferskom tlaku, odnosno prikazom ovisnosti sastava smjese o temperaturi. Eutektički dijagram je dijagram stanja za smjesu čije se komponente potpuno miješaju u kapljevitom stanju. Na slici 7. prikazan je eutektički dijagram za smjesu komponenata A i B te su jasno naznačena područja eutektika, eutektička točka i temperatura pri kojoj eutektik nastaje.



Slika 7. Eutektički dijagram.

DES-ovi se sastoje se od velikih nesimetričnnih iona male energije rešetke te zbog toga imaju nisku točku tališta. Obično se dobivaju kompleksiranjem kvaternih amonijevih soli s donorom matalne soli ili donorom vodikve veze (HBD). Delokalizacija naboja koja nastaje vodikovim vezanjem između, na primjer, halogenog iona i donora vodikove veze odgovorna je za smanjenje tališta smjese u odnosu na točke tališta pojedinih komponenata.[19] Koriste se uglavnom u kapljevitom stanju pri sobnoj temperaturi ili na temperaturi ispod 70°C. Najčešće se DES-ovi sastoje od kolin klorida (ChCl) i donora vodikove veze, a on može biti urea, etilen glikol, glicerol i drugi alkoholi, amino kiseline, karboksilne kiseline te šećeri.[9]

DES-ovi su zelena otapala pogodna za primjenu zbog svojih korisnih svojstava kao što su niska hlapivost, mala toksičnost, podesiva viskoznost te dobra mješljivost s vodom. Zbog toga se smatraju učinkovitim otapalima za otapanje i ekstrakciju širokog spektra nepolarnih i polarnih spojeva. Uz manji utjecaj na okoliš i gospodarstvo, imaju i druge prednosti kao što su niska cijena, dobra biorazgradivost, jednostavna metoda primjene i proizvodnje te visoki prinosi.[7,20]

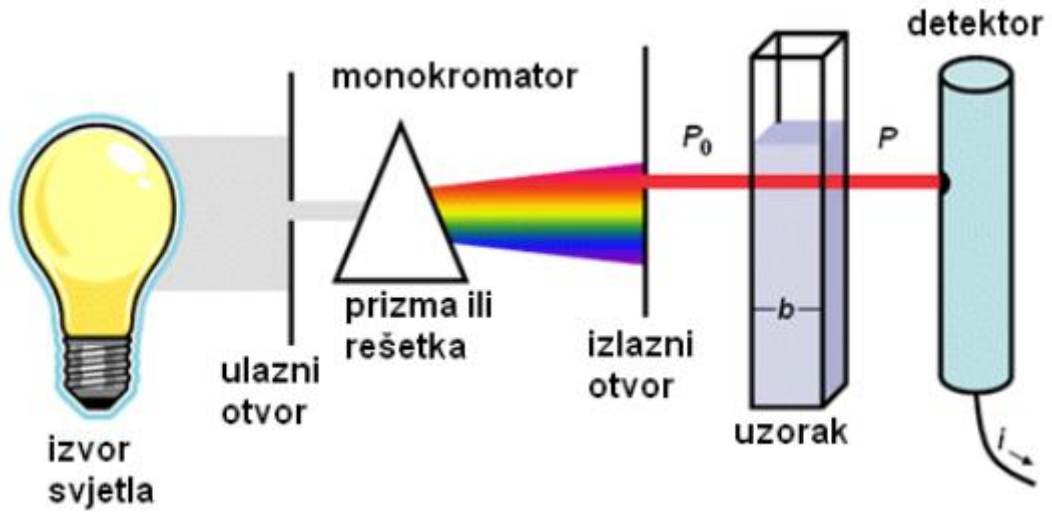
2.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE

2.4.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline

Sadržaj ukupnih fenola određuje se Folin-Ciocalteu metodom. Koncentracija ukupnih polifenola mjeri se na UV spektrofotometru.

Spektrofotometrija je naziv za bilo koju tehniku koja koristi svjetlost za mjerenje koncentracije.

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV/VIS) najviše se koristi za detektiranje konjugiranih sustava koji imaju snažne apsorpcije, a važni su prijelazi koji uključuju p-orbitale i njihove nepopunjene parove. UV/VIS spektroskopija (UV = 200-400 nm, VIS = 400-800 nm) odgovara pobuđivanju elektrona između energijskih nivoa koji odgovaraju molekulskim orbitalama sustava. UV/VIS spektar nastaje bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini.[21] Analiza spektra elektromagnetskog zračenja provodi se UV spektrofotometrom. Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, držač uzorka, monokromator i detektor, čiji je shematski prikaz dan na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz spektrofotometra.

Uzorak je smješten u prozirnoj posudi, kiveti, koja je najčešće širine 1 cm i načinjena je od kvarca. Spektrofotometar mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla (I_0). Pomoću tih podataka određuje se koncentracija analizirane vrste preko Beer-Lambertovog zakona:

$$A = -log\frac{I}{I_0} = \varepsilon cL$$

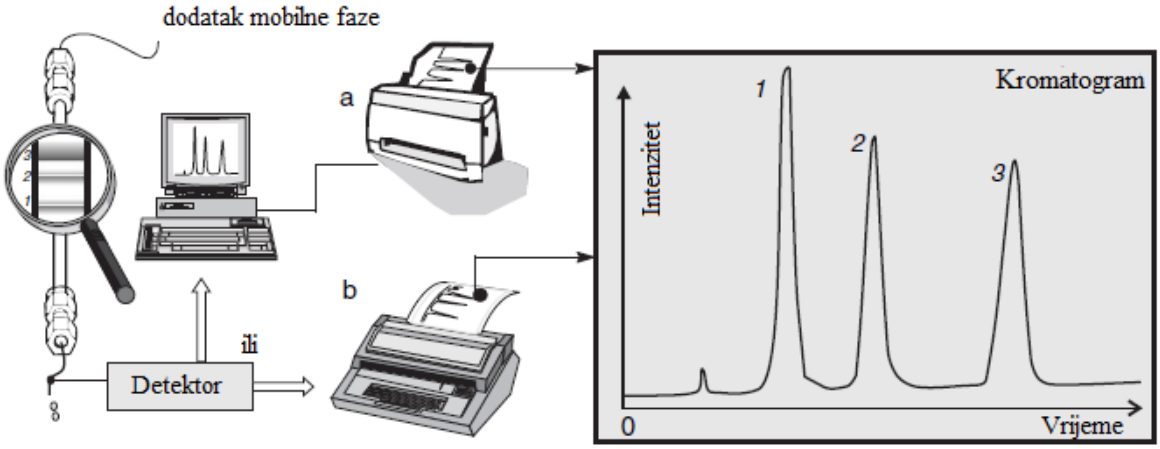
gdje je *A* apsorbancija, *ε* konstanta (molarna apsortivnost), *c* tražena koncentracija a *L* promjena valne duljine pri prolasku kroz uzorak.

2.4.2. Određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima lista masline

Oleuropein je najvažniji sekoiridoidni spoj zbog svojih farmakoloških učinaka, antioksidativan je, protuupalan, antikancerogen, antivirusni i antimikrobni.[22]

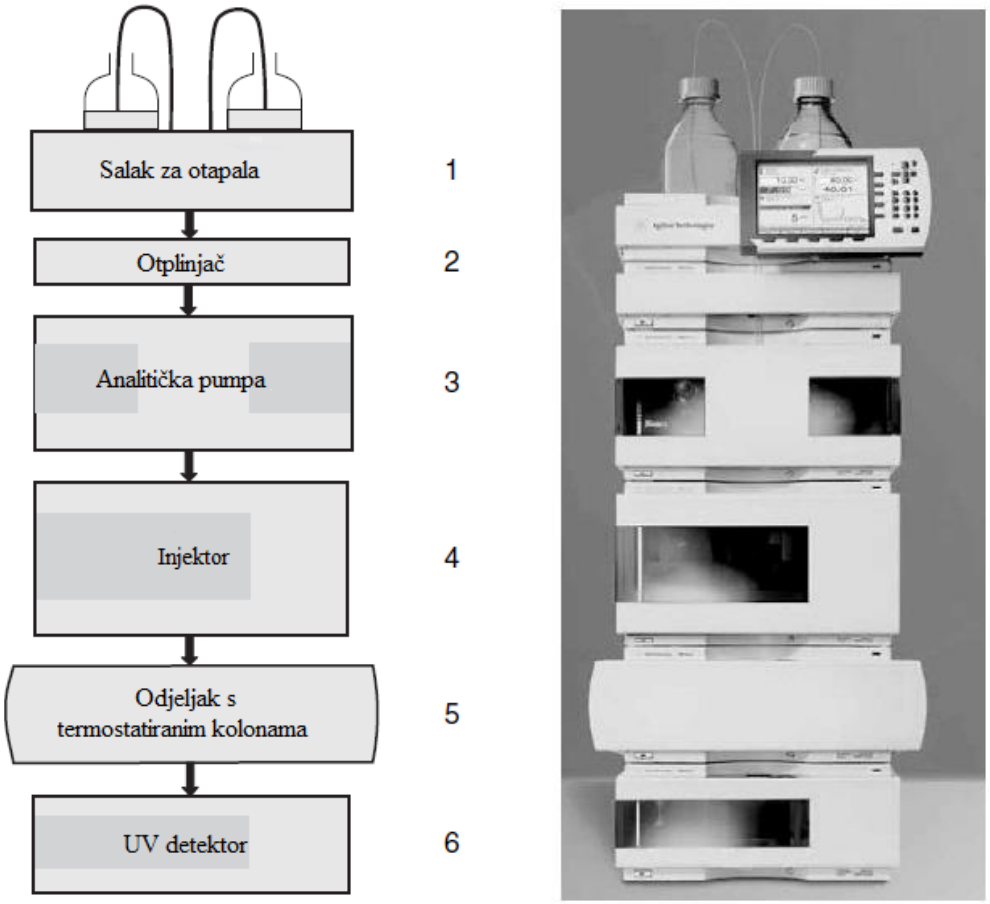
Sadržaj oleuropeina u ekstraktu određivan je pomoću tekuće kromatografije visokih performansi, HPLC (eng. *high-performance liquid chromatography*). HPLC je vrsta tekuće kromatografije koja koristi visoki tlak koji gura otapalo kroz zatvorene kolone načinjene od finih čestica koje daju razdvajanje visokih rezolucija.[23]

Općenito, kromatografija je naziv za grupu laboratorijskih tehnika koja služi za razdvajanje smjesa. Osnovno načelo zasniva se na različitoj raspodjeli komponenata uzorka između dvije faze, od kojih je jedna nepokretna, stacionarna faza, imobilizirana u koloni ili fiksirana na nosaču, dok se druga, mobilna faza, probija kroz prvu. Faze su odabrane tako da komponente uzorka imaju različitu topljivost u svakoj fazi. Grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka naziva se kromatogram. On predstavlja dvodimenzionalni prikaz varijacije sustava eluirajuće mobilne faze dok izlazi iz kolone. Kako bi nastao ovakav dijagram, na izlazu iz kolone potrebno je postaviti senzor. Signal detektora prikazan je na ordinati, dok je na apscisi prikazano vrijeme. Svaki pik na kromatogramu odgovara određenoj komponenti u smjesi.[24] Shema principa analize kromatografom, uređajem za kromatografiju, prikazana je na slici 9.



Slika 9. Shema principa analize kromatografom.

HPLC je suvremena analitička tehnika kod koje se mobilna faza dovodi pomoću pumpe pod visokim tlakom. Uzorak se ubacuje pomoću ručnog ili automatskog injektora. Instalacija se sastoji od nekoliko specijaliziranih jedinica koje mogu biti smještene kao zasebne cjeline ili mogu biti integrirane u zajednički okvir. Sustav cijevi vrlo malog unutarnjeg promjera (0,1 mm) osigurava cirkulaciju pokretne faze između modula. Takva cijevi za prijenos izrađene su od nehrđajućeg čelika ili od polieter-eterketona, obojenog i fleksibilnog polimera, sposobnog oduprijeti se uobičajenim otapalima pod visokim tlakovima (do 350 bara).[24] Shema modularnog HPLC uređaja prikazana je na slici 10.



Slika 10. Modularni HPLC.

3. METODIKA

3.1. SVRHA RADA

U ovom radu opisana je provedba ekstrakcije polifenolnih spojeva iz lista masline koristeći različita otapala, te različite masene udjele istog otapala. Proveden je odabir smjese otapala koja je imala najbolja ekstrakcijska svojstva, a zatim je korištenjem programskog paketa *Design Expert v. 8* određen optimalni sastav smjese za izdvajanje ukupnih fenola te oleuropeina. Također, ispitana je i mikrobiološka aktivnost ekstrakata koji su pokazali optimalnu koncentraciju ukupnih fenola te oleuropeina.

3.2. POPIS KORIŠTENIH KEMIKALIJA

U tablici 1. nalazi se popis kemikalija korištenih prilikom izrade ovog rada

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija.

KEMIKALIJE	*M*, g mol^{-1}
BET	117,15
LAK	360,31
FRU	180,16
MAL	360,32
Mli	90,08
PPG	425,00
SAH	342,30
SORB	182,17
VIN	150,09

3.3. LIST MASLINE

3.3.1. Priprema lista masline

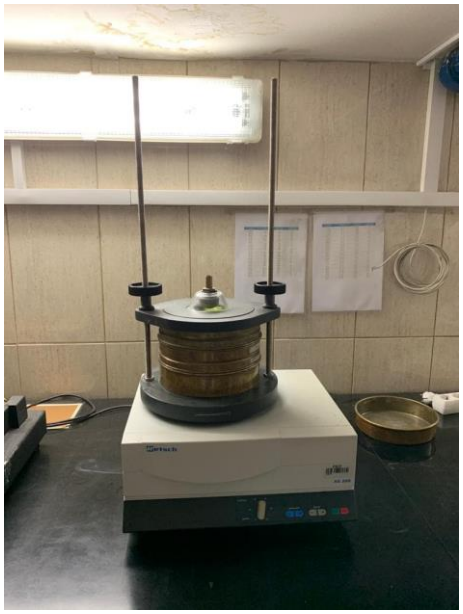
Maslina čiji su listovi korišteni u ovom radu potječe s otoka Ugljana, a vrsta masline naziva se oblica. Listovi su prikupljeni početkom ožujka 2020., potom su osušeni na sobnoj temperaturi, usitnjeni na električnom mlinu 1-2 minute, a zatim prosijani. Prosijavanje je rađeno na tresilici *Retsch AS200* pomoću sita promjera očica 800 µm u trajanju od 3 minute, uz amplitudu od 70%. Spomenuti postupci pripreme prikazani su na slici 11.



a)



b)



c)



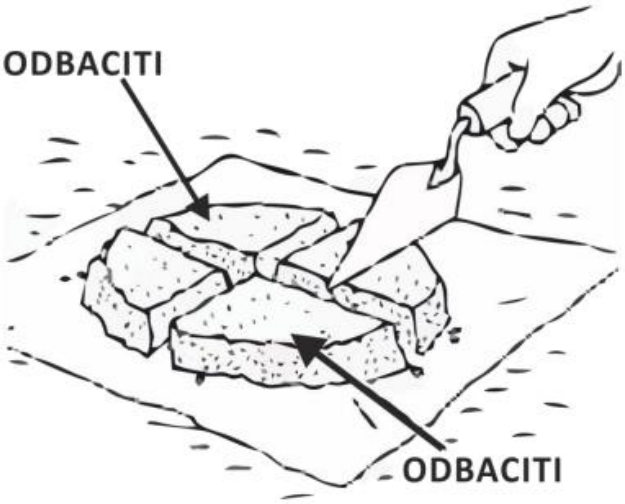
d)

Slika 11. Priprema lista masline: a) listovi masline prije obrade, b) usitnjavanje u električnom mlinu, c) prosijavanje u tresilici, d) listovi masline nakon obrade.

3.3.2. Uzimanje reprezentativnog uzorka

Za svaku daljnju analizu potrebno je imati reprezentativni uzorak lišća. Redukcija uzorka rađena je metodom četvrtanja, slika 12. Uzorak lišća oblikuje se u kvadrat ili krug te se podijeli

na četiri dijela. Dva nasuprotna dijela se odbace, dok se ostatak ponovno miješa i postupak se ponavlja dok se ne dobije najmanja količina uzorka potrebna za određenu analizu.





a) b)

Slika 12. a) Postupak četvrtanja, b) četvrtanje uzorka lišća masline.

3.3.3. Raspodjela veličina čestica lista masline

Raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije primjenom uređaja *Shimadzu SALD-3101* prikazanog na slici 13. Njegovo mjerno područje je 0,4 do 3000 μm. Raspodjele veličina čestica uzorka lista masline izmjerene su nekoliko puta te je rezultat izražen kao srednja vrijednost, odnosno srednji promjer čestica lišća.





a) b)

Slika 13.a) Uređaj laserske difrakcije *Shimatzu SALD.3101* (*Shimadzu*, Japan), b) postavljanje uzorka na uređaj.

3.3.4. Određivanje prave gustoće lista masline

Prava gustoća je omjer mase i volumena čestice i isključuje sve zatvorene i otvorene pore, a određena je piknometrom u p-ksilenu Albert-Bogsovom metodom. Uzorak osušenog lišća prenese se u tikvicu od 25 ml maksimalno do 1/3 volumena te važe. Zatim se u tikvicu dodaje p-ksilen dok mu nivo ne bude 3-5 mm iznad uzorka lišća, dobro se protrese te se doda p-ksilena do oznake. Izvaže se tako napunjena tikvica te se zabilježi odvaga. Prava gustoća računa se po formuli:

$$\rho_{prava} = \frac{m(suhog\ uzorka)}{V(tikvice) - V(dodanog\ p-ksilena)}$$

Izvagano je 1,5402 g lišća koje je stavljeno u tikvicu od 25 ml. Nakon toga je dodano 24 ml p-ksilena te je izračunata prava gustoća prema formuli.



a) b)

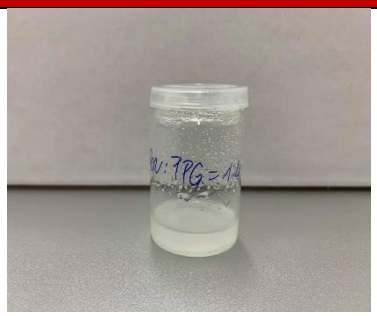
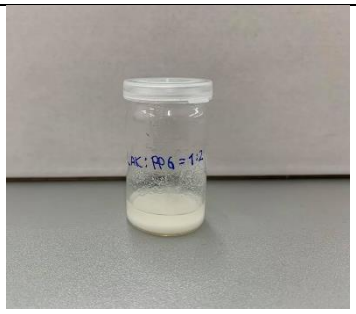
Slika 14. Određivanje specifične težine lišća a) dodatak lišća u tikvicu, b) nakon dodatka p-ksilena.

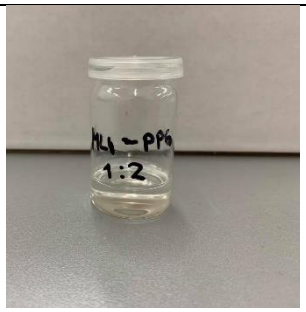
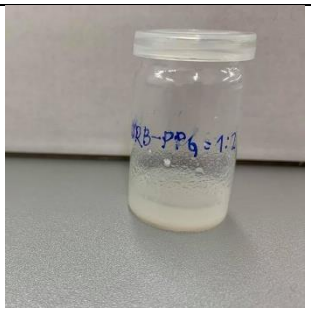
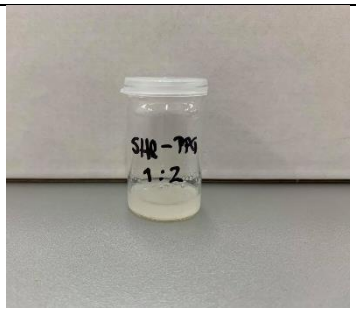
3.4. EKSTRAKCIJA

3.4.1. Odabir otapala

Prilikom odabira otapala, razmatrana je mješljivost polipropilen glikola s drugim komponentama, fruktozom (FRU), laktozom (LAK), maltozom (MAL), mliječnom kiselinom (Mli), sorbitolom (SORB), saharozom (SAH), betainom (BET) i vinskom kiselinom (VIN).). Izvagane odvage otopina pomiješane su sat vremena na magnetskoj miješalici pri temperaturi od 50-65°C. U tablici 2. dan je popis kombinacija koje su se pripremale za sintezu otapala, njihov molarni omjer, temperatura pri kojoj je provedeno miješanje te su prikazane fotografije svake pojedine otopine.

Tablica 2. Kombinacije komponenata za pripremu otapala.

Komponente		Molarni omjer	Temperatura/°C	Fotografija nastale otopine
FRU	**PPG**	1:4	60	
LAK	**PPG**	1:2	65	
MAL	**PPG**	1:2	50	

Mli	**PPG**	1:2	65	
SORB	**PPG**	1:2	65	
SAH	**PPG**	1:2	65	
BET	**PPG**	1:2	65	
VIN	**PPG**	1:2	60	

Za provođenje ekstrakcije odabrana je otopine mliječne kiseline (Mli) i polipropilen glikola (PPG). Naknadno je u istu otopinu dodano 10%, 20% te 40% vode, a izgled nastalih otopina vidljiv je na fotografijama prikazanim na slici 15.



a) b) c)

Slika 15. Prikaz otopina a) Mli:PPG:10%H_2O, b) Mli:PPG:20%H_2O, c) Mli:PPG:40%H_2O.

Nakon što je odabrano otapalo za ekstrakciju, Mli:PPG:H_2O, pomoću programa *Design Expert v.8* generirano je 16 otopina sa različitim masenim udjelima polipropilen glikola, vode i mliječne kiseline, kako bi se pronašao najbolji omjer za ekstrakciju lišća. Vrijednosti tih udjela prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Udjeli polipropilen glikola, vode i mliječne kiseline za pripremu različitih otopina.

Otopina	PPG%(w/w)	H_2O%(w/w)	Mli%(w/w)
1	0,567	0,333	0,100
2	0,100	0,800	0,100
3	0,100	0,890	0,010
4	0,363	0,627	0,010
5	0,286	0,636	0,078
6	0,681	0,286	0,033
7	0,681	0,286	0,033
8	0,286	0,636	0,078
9	0,495	0,495	0,010
10	0,286	0,636	0,078
11	0,800	0,100	0,100
12	0,100	0,890	0,010
13	0,845	0,100	0,055
14	0,450	0,450	0,100
15	0,845	0,100	0,055
16	0,890	0,100	0,010

3.4.2. Fourierova pretvorna infracrvena spektroskopija

FTIR metoda najčešće se upotrebljava za identifikaciju funkcionalnih skupina unutar molekula koje se karakteristično pojavljuju na odgovarajućim vrpcama (područje funkcionalnih skupina, 1200 - 1400 cm^{-1}).



Slika 16. Fotografija FTIR spektrofotometra *Vertex 70* s platinastim detektorom (Bruker).

Na slici 16. prikazan je uređaj na kojem su snimljeni FT-IR spektri korištenjem FT-IR spektrofotometra s platinastim detektorom (Bruker) u području valnih brojeva od 4500 do 500 cm^{-1} uz spektralnu rezoluciju od 2 cm^{-1}. Uzorci su snimljeni metodom koja u kratkom vremenu snima svaki uzorak s 32 pojedinačna mjerenja, a dobiveni FT-IR spektri njihova su srednja vrijednost.

3.4.3. Određivanje fizikalnih svojstava otapala

Određene su gustoće, viskoznosti te pH svake pojedine otopine otapala iz tablice 3. Gustoća je određena pomoću densitometra *Mettler Toredo Densito 30PX*, prikazanog na slici 17. Uzorak se uzima u špricu te se na zaslonu prikazuje vrijednost gustoće. Gustoća svake otopine mjeri se tri puta, a kao rezultat odabire se srednja vrijednost tri mjerenja. Nakon svake otopine, uređaj je potrebno isprati s destiliranom vodom.



Slika 17. Uređaj za mjerenje gustoće *Mettler Toredo Densito 30PX*..

Viskoznost otopina mjerena je pomoću rotametra *Brookfield DV-III ULTRA Programmable Rheometer*, prikazanom na slici 18. Mjerenje je provedeno pri temperaturi od 25°C. 8 ml uzorka stavi se u posudu za uzorak te se u uzorak uroni rotacijsko vreteno SC4-21. Rezultati se očitavaju na kompjuterskom sučelju te naknadno obrađuju u Excel-u.



Slika 18. Uređaj za mjerenje viskoznosti *Brookfield DV-III ULTRA Programmable Rheometer*.

pH otapala određena je pomoću pH sonde *WTW SenTix 81* prikazane na slici 19. Mjerenje se provodi pri 25°C tako što se sonda uroni u otopinu te se na kompjuterskom zaslonu očita pH

vrijednost nakon što se ona ustali. Sondu je potrebno detaljno isprati destiliranom vodom nakon svakog mjerenja.



Slika 19. pH sonda *WTW SenTix 8.*

3.4.4. Provedba ekstrakcije

Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz lista masline provodi se pomoću magnetske miješalice marke *Tehnica Rotamix 609 MM* snage 15 W te *2mag MIX 15 eco* snage 10 W prikazanih na slici 20. Vrijeme provođenja ekstrakcije je 3 sata, pri intenzitetu od 300-400 okretaja/min. Za provedene ekstrakcije korišteno je 0,5 g ili 0,2 g lišća otopljeno u 10 g otapala.



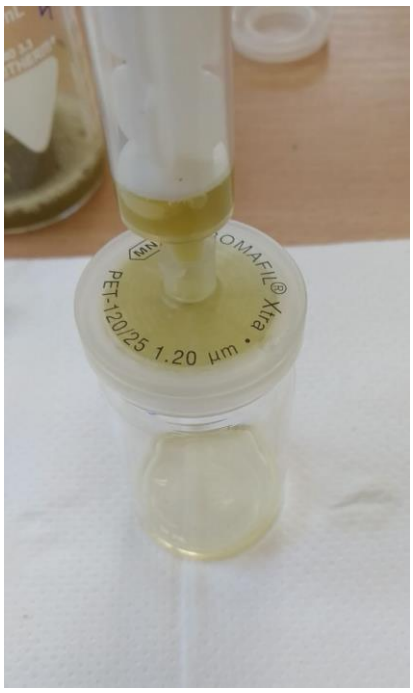


a) b)

Slika 20. Magnetna miješala a) *Tehnica Rotamix 609 MM*, b) *2mag MIX 15 eco.*

3.4.5. Filtracija uzorka

Nakon provedene ekstrakcije, potrebno je odvojiti ekstrakt koji se koristio u daljnjem istraživanju. Filtracija se provela uzimanjem uzorka u špricu te filtriranjem kroz filter *Chromafil Xtra PET-45/25*.

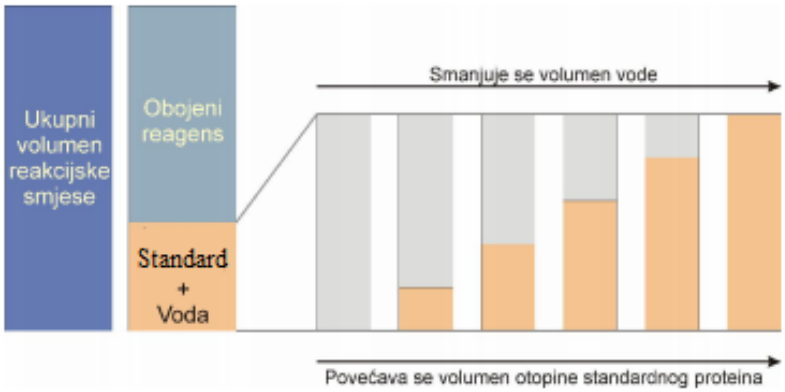


Slika 21. Filtriranje uzorka.

3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE

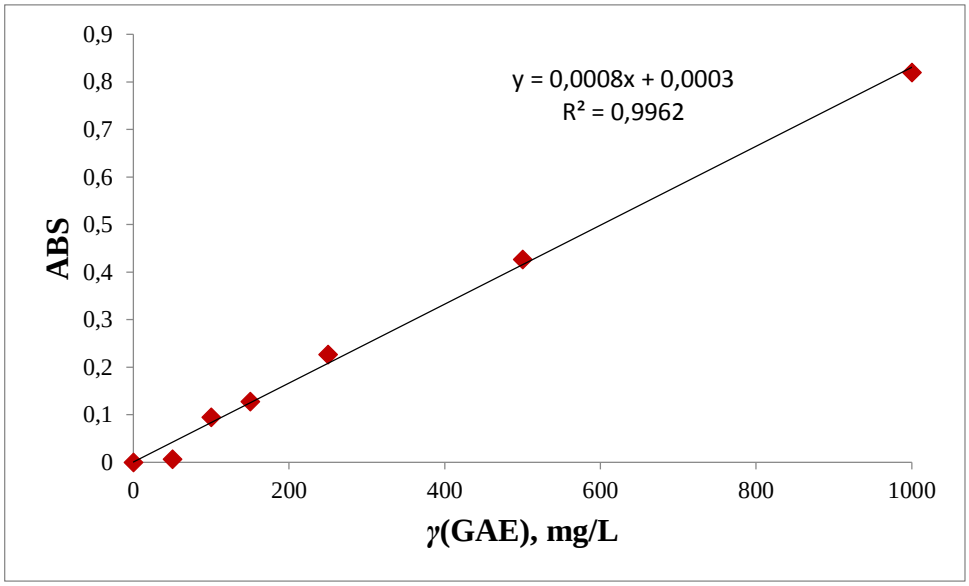
3.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline

Baždarni dijagram prikazuje ovisnosti intenziteta apsorbancije otopine molekula o koncentraciji. Baždarni dijagram je pripremljen pomoću otopina različite koncentracije galne kiseline (GAE, eng. *galic acid*) uz dodatak Folin-Ciocalteu reagensa. Reagens stupa u reakciju sa standardom i dovodi do obojene reakcije. Intenzitet obojenja jači je kod otopina s većom koncentracijom standarda.



Slika 22. Shematski prikaz određivanja baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih polifenola.

Kako bi se pripremila štok otopina, u tikvici od 100 ml otopljeno je 0,5 mg GAE u destiliranoj vodi. Zatim je u šest tikvica od 100 ml dodano 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml i 20 ml alikvota i destilirane vode do oznake. Sljedeći korak je priprema otopina za mjerenje Folin-Ciocalteu metodom. Nakon sat vremena stajanja u vrućoj kupelji na 40°C, vrši se mjerenje na UV spektrofotometru pri maksimumu apsorbancije od 765 nm. Dobiveni baždarni dijagram prikazan je na slici 23.



Slika 23. Baždarni dijagram galne kiseline.

Za određivanje ukupne koncentracije polifenola u ekstraktu korištena je standardna Folin-Ciocalteu (FC) metoda, a koncentracija je mjerena na UV spektrofotometru *Shimadzu UV-128* prikazanom na slici 23. Mjerenjem apsorbancije pri maksimalnoj valnoj duljini od 765 nm kvantitativno je određena koncentracija ukupnih polifenola te je izražena preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline.



Slika 24. UV spektrofotometar, *Shimadzu UV-128.*

FC metoda provodite se tako da se tikvicu od 10 ml odpipetira 400 µl Folin-Ciocalteu reagensa i 60 µl uzorka. Zatim se tikvice stavljaju na tamno mjesto na 8 minuta. Nakon 8 minuta dodaje se 4 ml 7%-tne otopine Na_2CO_3 te se otopina razrjeđuje destiliranom vodom do oznake. Svaki

uzorak priprema se tri puta. Pripremljene otopine omotavaju se aluminijskom folijom te stavljaju na sat vremena u termostatiranu kupelj na 40°C. Nakon termostatiranja, mjeri se intenzitet apsorbancije koji je direktno proporcionalan koncentraciji ukupnih polifenola u uzorku.

3.5.2. Određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima lista masline

Za ispitivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktu korišten je HPLC uređaj *Agilent 1200 series, Agilent Tehnologies, USA* sa automatskim injektorom, DAD detektorom i *Zorbax Eclipse XDB-C18* kolonom. Standard oleuropein (98%) je iz *Sigma-Aldrich (US).*



Slika 25. HPLC uređaj *Agilent 1200 series, Agilent Tehnologies, USA.*

Standardna otopina oleuropeina (0,2 mg/ml) i otopina ekstrakta (1 mg/ml) pripremljeni su u metanolu i filtrirani kroz 0,45 μm PTFE filter šprice. Maksimalna valna duljina iznosi 254 nm, a jednadžba za određivanje koncentracije oleuropeina, izračunata iz baždarne krivulje oleuropeina pomoću regresijske analize, bila je:

$$y = 782{,}64x + 5{,}2267$$

gdje je *y* površina ispod krivulje (proizvoljne jedinice), a *x* je masa oleuropeina u primjenjivanoj otopini u μg. (R^2=0,9992)

3.6. MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST

U svrhu određivanja mikrobiološke aktivnost, ispitana je prisutnost bakterija.

Za ispitivanje prisutnosti bakterija uzorak je bilo potrebno prenijeti na hranjivi agar u praznu Petrijevu zdjelicu te inkubirati na 37°C u periodu od 24 do 48 h. Kako bi se uzorak što bolje prenio na hranjivu površinu, korištena je metoda broja 8 i metoda po Drigalskom. Metoda broja 8 podrazumijeva dodavanje 1 ml uzorka u Petrijevu zdjelicu, zalijevanje uzorka sa hranjivim agarom i homogenizaciju pomicanjem Petrijeve zdjelice u obliku broja 8. Metoda po Drigalskom znači dodavanje 0,1 ml uzorka na hranjivi agar i homogenizacija štapićem po Drigalskom.



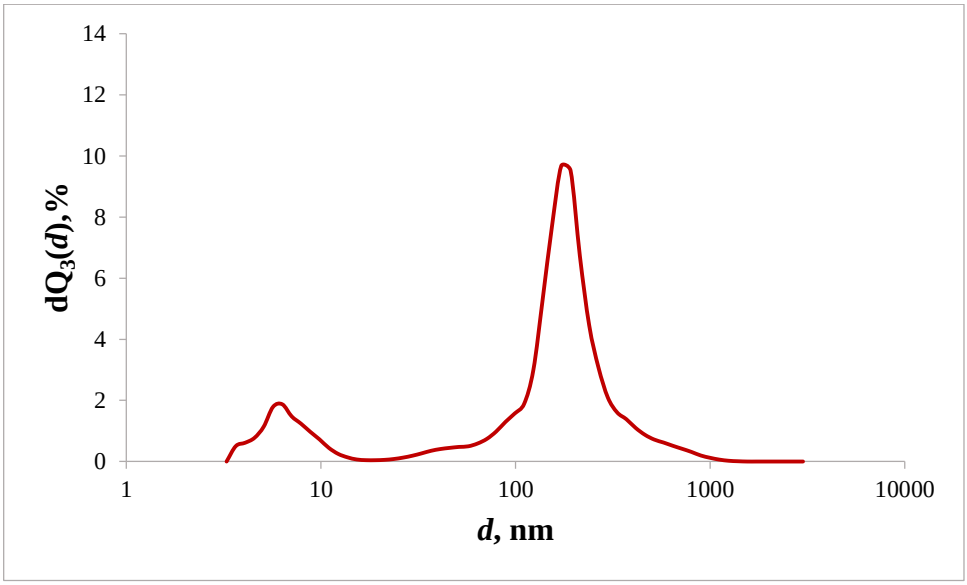
Slika 26. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. LIST MASLINE

4.1.1. Raspodjela veličina čestica

Nakon određivanja raspodjele veličina čestica na uređaju za lasersku difrakciju *SALD-3101*, rezultati su obrađeni te su prikazani u obliku grafikona na slici 27. Srednja vrijednost, odnosno srednji promjer čestica lišća iznosi 430,01 nm.



Slika 27. Raspodjela veličina čestica lišća.

4.1.2. Određivanje prave gustoće lišća masline

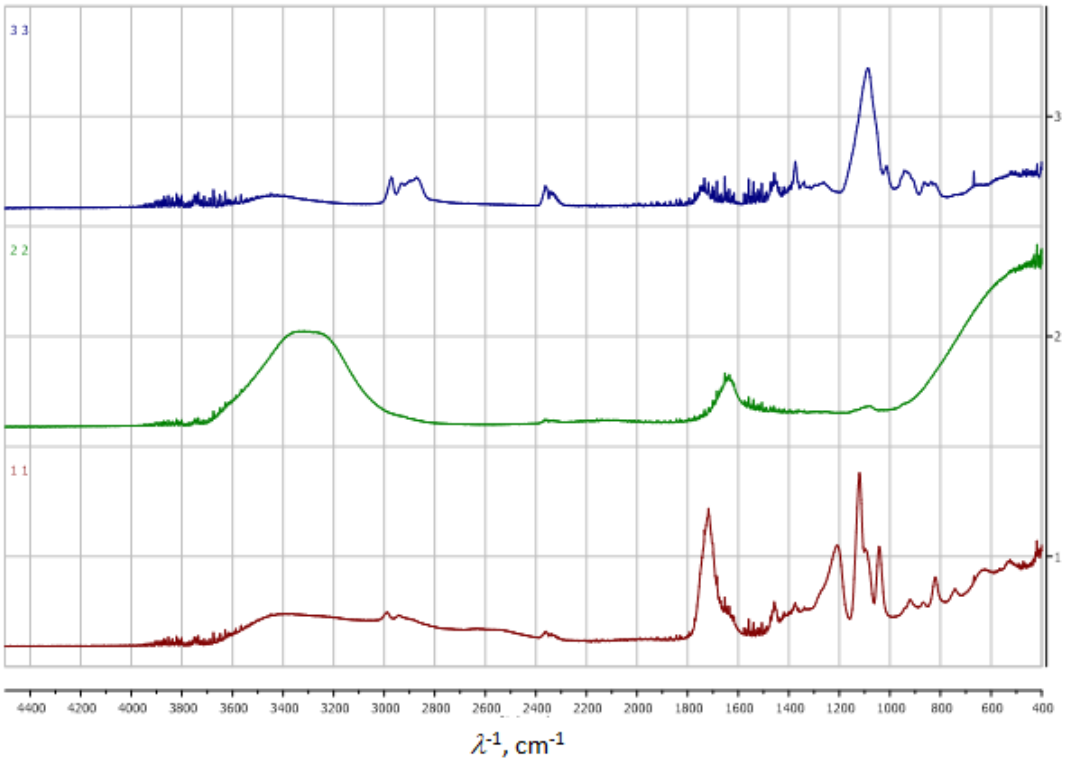
Prava gustoća lišća određena je Albert-Bogsovom metodom i iznosi 1,5402 g/cm^3, što je unutar raspona gustoće praškastih materijala.

$$\rho_{prava} = \frac{m(suhog\ uzorka)}{V(tikvice) - V(dodanog\ p-ksilena)} = \frac{1{,}5402\ g}{25\ ml - 24\ ml} = 1{,}5402\ g/cm^3$$

4.2. EKSTRAKCIJA

4.2.1. Odabir otapala

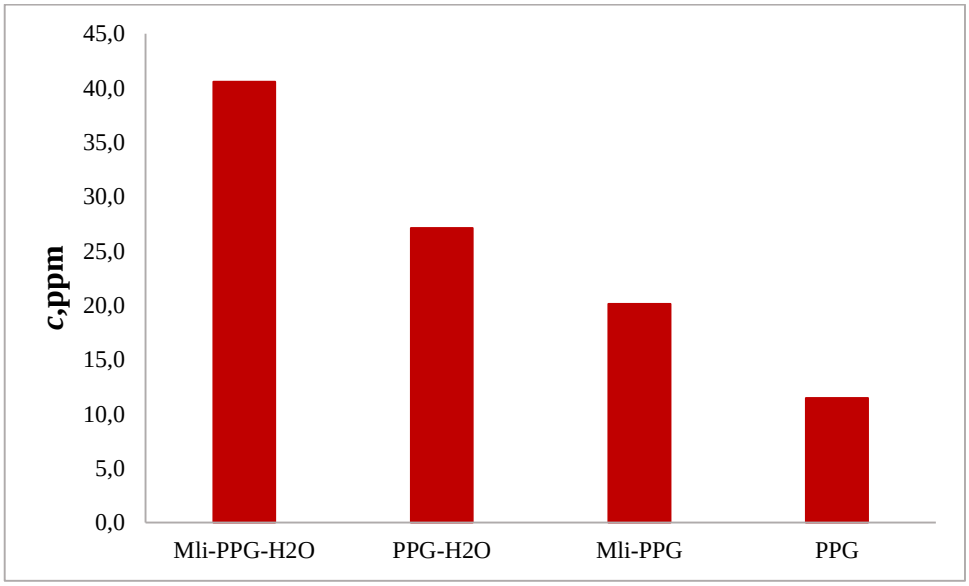
Prije provođenja ekstrakcije, bilo je potrebno odabrati pogodno otapalo. Kako je ranije opisano, pomiješan je polipropilen glikol sa drugim komponentama te je promatrano kako se otopine ponašaju nakon homogenizacije. Sve komponente osim mliječne kiseline istaložile su na dno pri sobnoj temperaturi te je zbog toga otopina koja se sastoji od polipropilen glikola i mliječne kiseline odabrana za daljnje istraživanje. Također, napravljen je i FTIR spektar otopina, mliječna kiselina, PPG 400 i smjesa otapala Mli:PPG u molnom omjeru 1:2 koji je prikazan na slici 28. Iz prikazanih FTIR spektara može se zaključiti da se nije formirao DES, jer su neki od pikova pojedinačnih komponenti nestali u spektru koji prikazuje smjesu kapljevina.



Slika 28. FTIR spektar za otapala: mliječna kiselina, ——, PPG 400, ——i Mli:PPG-1:2 ——.

Kako bi se izdvojile fitokemikalije iz biljaka potrebno je provesti čitav niz koraka. Neki od njih su: mljevenje, homogenizacija i ekstrakcija. Među tim koracima, ekstrakcija je izrazito važna jer na njezinu uspješnu provedbu utječu kemijska priroda fitokemikalija, korištena metoda ekstrakcije, veličina čestica, korišteno otapalo kao i prisutnost različitih tvari koje mogu inhibirati proces ekstrakcije.[25]

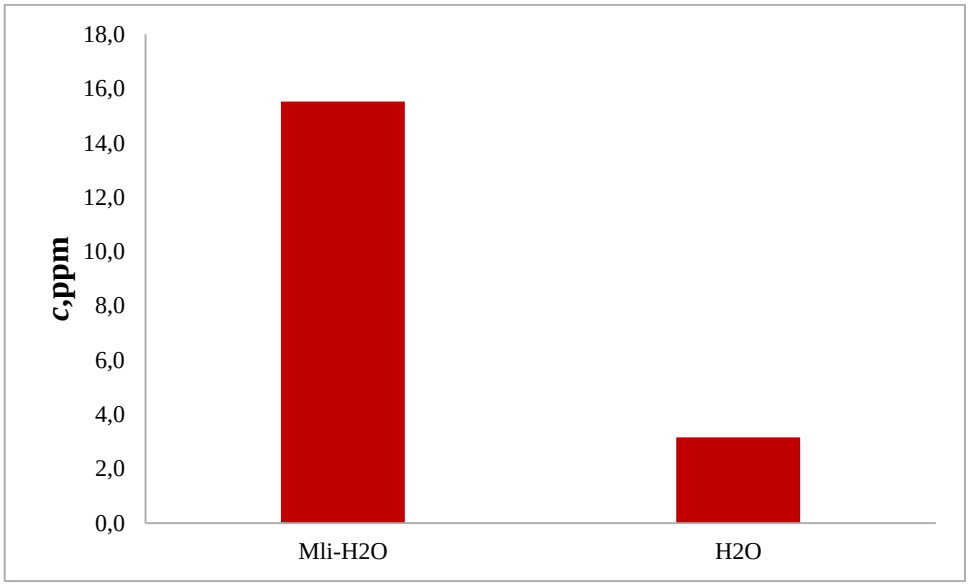
Kako učinkovitost ekstrakcije značajno ovisi o otapalu važno je ispitati utjecaj različitih otapala, ali i smjese otapala. Kako bi se olakšao odabir otapala, pod istim uvjetima provedbe (vrijeme ekstrakcije, temperatura), provedene su ekstrakcije s otopinama Mli-PPG-H_2O, PPG-H_2O, Mli-PPG i samo PPG. Molarni omjer Mli:PPG je 1:2, a u otopini gdje je dodana voda nalazi se 50% vode i 50% otopine Mli:PPG. Rezultati tih ekstrakcija prikazani su na slici 29.



Slika 29. Prikaz rezultata ekstrakcije s različitim otapalima.

Najviše polifenolnih spojeva ekstrahirano je u smjesi otapala Mli-PPG-H_2O, čak 40,59 ppm. S otapalom PPG-H_2O ekstrahirano je 27,12 ppm, s Mli-PPG 20,12 ppm, a samo sa PPG 11,45 ppm.

Naknadno je provedena ekstrakcija gdje se kao otapalo koristila čista voda te otopina u kojoj se nalazi 94,5% vode i 5,5% mliječne kiseline. Rezultati ovih ekstrakcija prikazani su na slici 30.



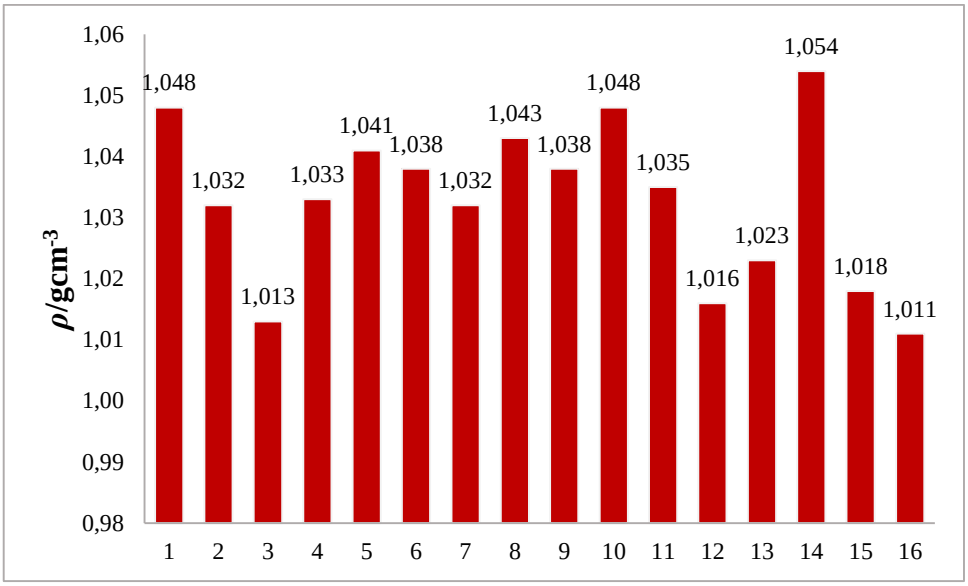
Slika 30. Rezultati ekstrakcija sa vodom i s otopinom vode i mliječne kiseline.

Prilikom ekstrakcije s vodom i mliječnom kiselinom ekstrahirano je 15,541% polifenolnih spojeva, dok je s vodom ekstrahirano 3,154% polifenolnih spojeva. Ovi rezultati ne mogu se izravno usporediti sa rezultatima prikazanim na slici 27. jer je ekstrakcija sa otapalima prikazanim na slici 27. rađena sa 0,5 g lišća u 10 g otapala, dok je ekstrakcija s otapalima prikazanim na slici 28. rađena s 0,2 g lišća u 10 g otapala, pa je samim time ekstrahirana i manja koncentracija polifenola. Ipak, možemo zaključiti da je najbolje otapalo ono koje se sastoji od polipropilen glikola, vode i mliječne kiseline, budući da je sa tim otapalom ekstrahirano više od dvostruke koncentracije nego sa mliječnom kiselinom i vodom.

Sljedeći korak bio je pronaći pravi omjer polipropilen glikola, vode i mliječne kiseline.

4.2.2. Fizikalna svojstva otapala

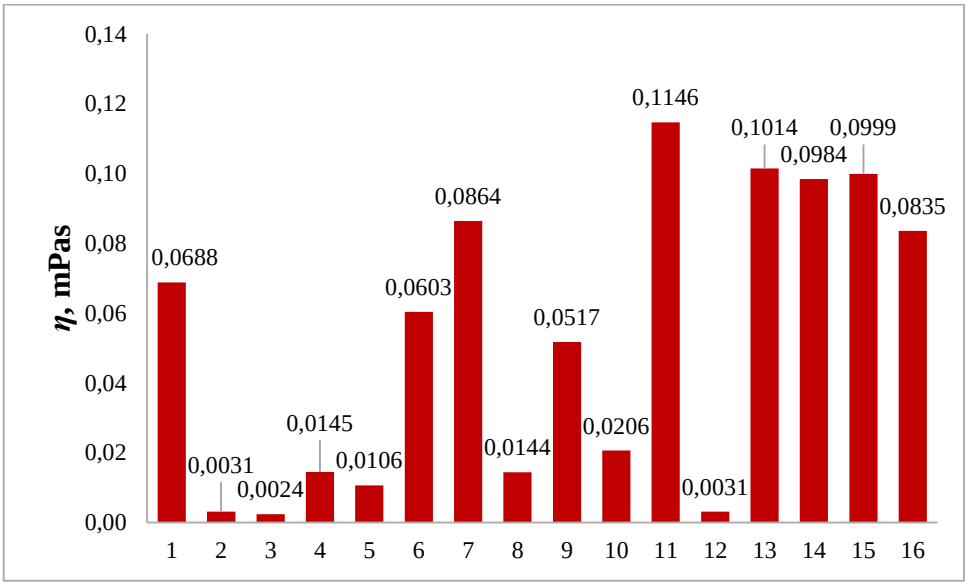
Nakon što je odabrano otapalo za ekstrakciju, pripremljeno je 16 različitih otopina čiji sastav je prikazan u tablici 3. te su ispitala fizikalna svojstva tih otapala. Vrijednosti gustoća prikazane su na slici 31., vrijednosti viskoznosti na slici 32., a vrijednosti pH na slici 33.



Slika 31. Usporedba vrijednosti gustoće za različite smjese otapala, ρ, gcm^{-3}.

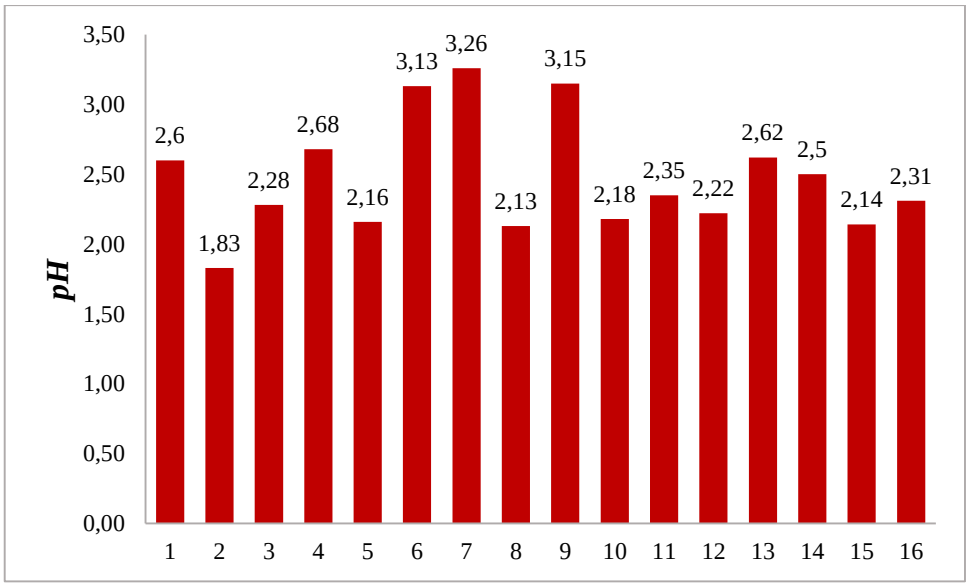
Najveću vrijednost gustoće ima otopina s 45% polipropilen glikola, 45% vode i 10% mliječne kiseline, dok najmanju gustoću ima otopina s 89% polipropilen glikola, 10% vode i 1% mliječne kiseline. Radi se o aditivnom svojstvu te gustoća smjese otapala ovisi o udjelima otapala od kojih je smjesa pripravljena. Kako relativna gustoća mliječne kiseline iznosi 1,2 i najveća od ove tri kapljevine (relativna gustoća PPG-a je u rasponu 0,855 do 0,946) izmjerene gustoće u skladu su s izrazom:

$$\rho_s = \sum_i \rho_{i\cdot} \cdot \phi_i$$



Slika 32. Vrijednosti viskoznosti za ispitane smjese otapala.

Najveću vrijednost viskoznosti ima otopina s 80% polipropilen glikola, 10% vode i 10% mliječne kiseline, dok najmanju viskoznost ima otopina s 10% polipropilen glikola, 89% vode i 1% mliječne kiseline. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da udio polipropilen glikola znatno doprinosi viskoznosti. Otopine u kojima je veći udio polipropilen glikola imaju veću viskoznost od onih u kojima je veći udio vode. Jednako tako, vidi se i da mliječna kiselina doprinosi povećanju viskoznosti. Tako otopina u kojoj je 89% polipropilen glikola (otopina broj 16) ima manju viskoznost od one koja ima 80% polipropilen glikola (otopina broj 11), jer je u prvoj 1% mliječne kiseline, a u drugoj čak 10% mliječne kiseline. Obje otopine sadrže 10% vode.



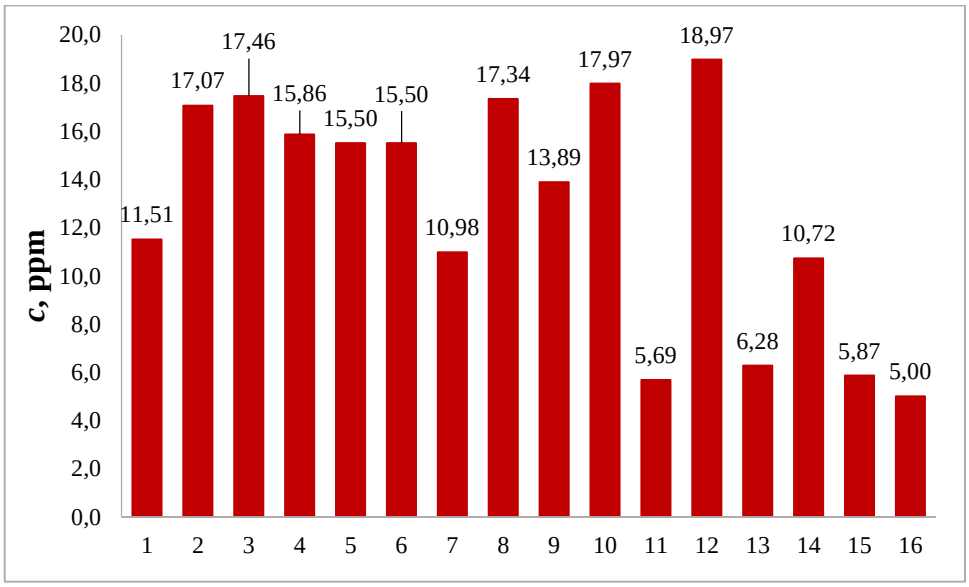
Slika 33. pH vrijednosti.

Sve ispitane otopine imaju niski pH, čije vrijednosti se kreću između 1,83 i 3,26. Najveću vrijednost pH ima otopina s 68% polipropilen glikola, 29% vode i 3% mliječne kiseline, dok najmanji pH ima otopina s 10% polipropilen glikola, 89% vode i 10% mliječne kiseline. Povećanju kiselosti doprinosi veći udio mliječne kiseline.

4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA LISTA MASLINE

4.3.1. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima lista masline

Nakon što je odabrana smjesa otapala i ispitana su njihova fizikalna svojstva, provedene su ekstrakcije sa svih 16 otapala navedenih u tablici 3. te su na UV spektrofotometru izmjerene koncentracije ukupnih polifenola u svakom od uzoraka. Rezultati ekstrakcije prikazani su na slici 34.



Slika 34. Koncentracija ukupnih polifenola.

Najveća koncentracija polifenola, 18,97 ppm, ekstrahirana je iz otopine 12, čije otapalo sadrži 10% polipropilen glikola, 89% vode i 1% mliječne kiseline, dok je najmanja koncentracija polifenola, 5,00 ppm, ekstrahirana iz otopine čije otapalo sadrži 89% polipropilen glikola, 10% vode i 1% mliječne kiseline. Općenito, može se vidjeti da ovo otapalo ima niski pH, viskoznost i gustoću. Otapala koja imaju slične vrijednosti fizikalnih svojstava (2, 3, 8 i 10) također su ekstrahirala visoke koncentracije polifenola (> 17 ppm). Osim određenih fizikalnih svojstava i polarnost otapala određuje uspješnost ekstrakcije. Otapala veće polarnosti poboljšavaju ekstrakciju polifenola. Najveću polarnost od korištenih kapljevina ima voda, zatim mliječna kiselina. Iz dobivenih podataka vidljivo je da voda znatno doprinosi ekstrakciji.

Iz dobivenih podataka, pomoću programa *Design Expert v. 8*, dobiveni je sastav od 10% polipropilen glikola, 84,4% vode i 5,6% mliječne kiseline kao najpogodnije otapalo za ekstrakciju lišća. Provedene su također ekstrakcije i s otapalom sastavljenim od 23,3%

polipropilen glikola, 67,8% vode i 8,9% mliječne kiseline. Rezultati ovih dviju ekstrakcija prikazani su u tablici 4.

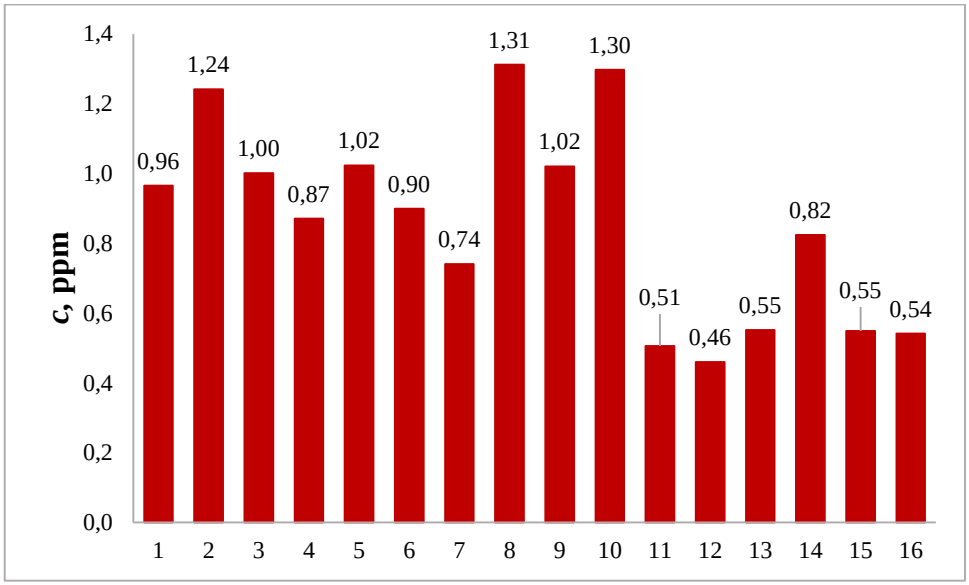
Tablica 4. Vrijednosti koncentracija ukupnih polifenola za četiri ekstrakcije.

Otapalo	***c*/ppm**
(10)PPG-(84,4)H_2O-(5,6)Mli	18,17
(23,3)PPG-(67,8)H_2O-(8,9)Mli	17,80

Pomoću prvog otapala ekstrahirano je 18,17 ppm polifenola te se ono doista pokazala odličnim za ovakvu ekstrakciju.

4.3.2. Određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima lista masline

Kako bi se odredila koncentracija polifenolnog spoja oleuropeina, provedeno je mjerenje na HPLC uređaju. Vrijednosti koncentracije oleuropeina pri ekstrakciji sa 16 otapala spomenutih u tablici 3. prikazani su na slici 35.



Slika 35. Grafički prikaz koncentracije oleuropeina u ekstraktima.

Kako je vidljivo iz grafičkog prikaza, najveća koncentracija oleuropeina, 1,31 ppm, ekstrahirana je s otapalom koje sadrži 28,6% polipropilen glikola, 63,6% vode i 7,8% mliječne kiseline. Zanimljivo je da je najmanje oleuropeina, 0,46 ppm, ekstrahirano upravo pomoću otapala kojim je ekstrahirano najviše ukupnih polifenola, ono koje sadrži 10% polipropilen glikola, 89% vode i 1% mliječne kiseline. Ukoliko zanemarimo ovaj rezultat, najmanje

oleuropeina ekstrahirano je pomoću istih otapala (otapala broj 11, 13, 15 i 16) s kojima je ekstrahirano i najmanje ukupnih polifenola. Možemo pretpostaviti da je u ovom uzorku došlo do pogreške prilikom pripreme uzorka ili prilikom mjerenja. Moguće je i da ovaj sastav otapala poboljšava topljivost nekih drugih polifenola što pridonosi većoj koncentraciji ukupnih polifenola.

Kao što je već ranije rečeno, nakon ovih 16 eksperimenata, odabrana su dva optimalna omjera otapala pomoću programa *Design Expert v. 8*. Nakon što je provedena ekstrakcija s tim otapalima, izmjerene su koncentracije oleuropeina te su rezultati prikazani u tablici 5.

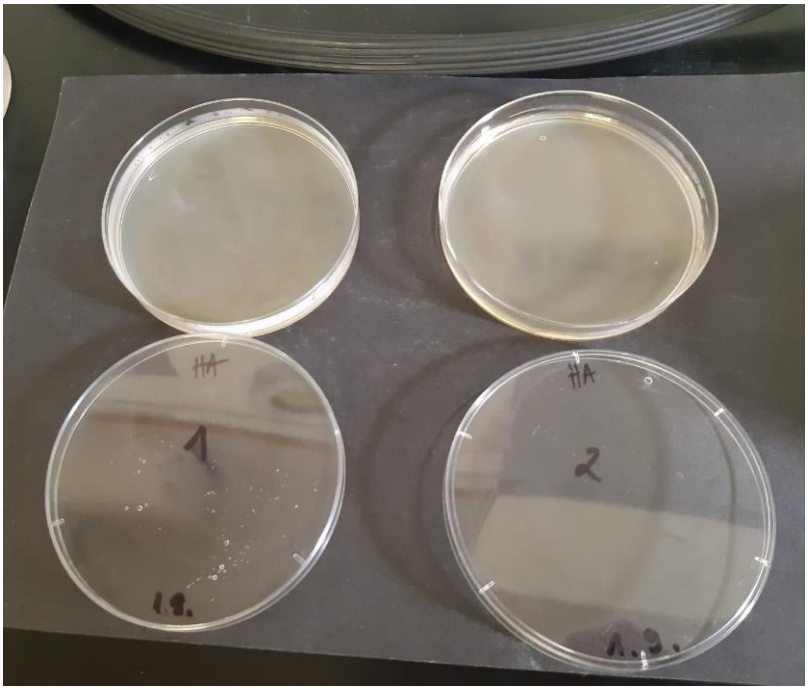
Tablica 5. Vrijednosti koncentracija oleuropeina za dvije ekstrakcije.

otapalo	***c*/ppm**
(10)PPG-(84,4)H_2O-(5,6)Mli	1,08
(23,3)PPG-(67,8)H_2O-(8,9)Mli	1,18

Vrijednost koncentracije oleuropeina od 1,18 ppm doista je jedan od najvećih vrijednosti koncentracije, no neka otapala spomenuta u tablici 1. (otapalo broj 2, 8 i 10) pokazala su bolju moć ekstrakcije polifenola iz lišća masline.

4.4. MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST

Nakon provedenog mikrobiološkog ispitivanja, utvrđeno je da u uzorcima ekstrakta nisu prisutne bakterije, odnosno, ekstrakti doista pokazuju antibakterijsko djelovanje. Na slici 36. prikazani su rezultati mikrobiološke analize. Brojem 1 označen je uzorak gdje se otapalo korišteno za ekstrakciju sastojalo od 10% polipropilen glikola, 84,4 % vode i 5,6 % mliječne kiseline, a brojem 2 označen je uzorak gdje se otapalo korišteno za ekstrakciju sastojalo od 23,3% polipropilen glikola, 67,8% vode i 8,9% mliječne kiseline.



Slika 36. Mikrobiološka aktivnost ekstrakata lista masline.

S obzirom da u analiziranim uzorcima nema mikrobioloških kolona, ovi ekstrakti lišća masline pogodni su za daljnju primjenu u kozmetičkoj industriji.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu, svrha je bila ispitati utjecaj sastava otapala na koncentraciju ukupnih polifenola i koncentraciju oleuropeina u ekstraktima lista masline te ispitati mikrobiološku aktivnost uzoraka.

Nakon priprave i karakterizacije otapala te provedbe ekstrakcija, doneseni su sljedeći zaključci:

- Otapalo koje je pogodno za primjenu kod ekstrakcije polifenola iz lišća masline sastoji se od polipropilen glikola, vode i mliječne kiseline
- S otapalom koje sadrži 10% polipropilen glikola, 89% vode i 1% mliječne kiseline ekstrahirano je najviše ukupnih polifenola iz lišća masline, 18,97 ppm
- S otapalom koje sadrži 28,6% polipropilen glikola, 63,6% vode i 7,8% mliječne kiseline ekstrahirano je najviše oleuropeina iz lišća masline, 1,311 ppm
- U uzorcima nema mikrobioloških kolona te su korišteni ekstrakti lišća masline pogodni za daljnju upotrebu u kozmetičkoj industriji

Iako su najveće vrijednosti koncentracija ukupnih polifenola i oleuropeina dobivene pri ekstrakciji s otapalima u kojima je veliki udio vode, dokazano je da samo voda nije dovoljno dobro otapalo te je najbolja kombinacija ona u kojoj je i polipropilen glikol i mliječna kiselina.

6. POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA

Skraćenice

ABS	apsorbancija
BET	betain
DES	niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *deep eutectic solvents*)
FC	Folin-Ciocalteu metoda
FRU	fruktoza
FTIR	Fourierova pretvorna infracrvena spektroskopija
GAE	galna kiselina (eng. *galic acid*)
HBA	aceptor vodikove veze (eng. *hydrogen bond acceptor*)
HBD	donor vodikove veze (eng. *hydrogen bond donor*)
HPLC	tekuća kromatografija visokih performansi (eng. *high-performance liquid chromatography*)
IL	ionske kapljevine (eng. *ionic liquids*)
LAK	laktoza
MAL	maltoza
Mli	mliječna kiselina
PPG	polipropilen glikol
SAH	saharoza
SORB	sorbitol
VIN	vinska kiselina

Simboli

A	apsorbancija, -
c	molarna koncentracija, mol/L
I	intenzitet svjetla, cd
I_0	intenzitet upadnoj svjetla, cd
L	promjena valne duljine pri prolasku kroz uzorak, m
pH	mjera kiselosti, -
γ	masena koncentracija, g/dm^3
ε	konstanta (molarna apsortivnost), L/molcm
η	kinematička viskoznost, mPas
ρ	gustoća, g/cm^3
ϕ	volumni udio, -

7. LITERATURA

1. O. Benavente-Garcia, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno, J. A. Del Rio, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, Food Chemistry 68 (2000) 457-462
2. P. Vogel, I. Kasper Machado, J.Garavaglia, V. T. Zani, D. de Souza, S. Morelo Del Basco, Polyphenols benefits of olive leaf (Olea europaea L) to human health, Nutricion Hospitalaria, 31 (3) (2015), 1427-1433
3. D. Kantoci, Maslina, Glasnik zaštite bilja 6 (2006) 4-14
4. R. M. Seabra, P. B. Andrade, P. Valentao, A.G. Palce, M. B. P. P. Olivelra, Phenolic Profile of Portuguese Olives: Ciltivar and Geographics, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention (2010) 177-186
5. D. Kačić Grgić, M. Gavran, K. Miškić, A. Škunca, V. Ocelić Bulatović, Utjecaj komine masline na okoliš, Kemija; Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske 69 (3-4) (2020) 153-162
6. M. A. Hashmi, A. Khan, M. Hanif, U. Farooq, S. Perveen, Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive), Evidence.Based Complementary and Alternative Medicine (2015)
7. M. E. Alanon, M. Ivanović, A. M. Gomez-Caravaca, D. Arraez-Roman, A. Sedgura-Carretero, Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds for olive leaf, Arabian Journal of Chemistry (2018)
8. S. Sahin, R. Samli, Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology, Ultrasonics Sonochemistry 20 (2013) 595-602
9. M. Ruesgas-Ramon, M. C. Figueroa-Espinoza, E. Durand, Application of deep eutectic solvents (DES) for pfenolic compounds extraction: Overview, challenges and opportunities, Journal of Agricultural and Food Chemistry 65 (2017), 3591-3601
10. https://hr.wikipedia.org/wiki/Fenoli (pristup 18.5.2020.)
11. K. Rajbhar, H. Dawda, U. Mukundan, Polyphenols: Methods of extraction, Scientific Reviews & Chemical Communications 5(1) (2015), 1-6
12. R. Dias, H. Oliveira, I. Fernandes, J. Simal-Gandara, R. Perez-Gregorio, Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics, Critical Reviews in food science and nutrition (2020)

13. E. Altiok, D. Baycin, O. Bayraktar, S. Ulku, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (Olea europaea L.) by adsorption on silk fibroin, Separation and Purification Tehnology 62 (2008), 342-348
14. R. Tsao, Chemistry and Biochemistry od dietary polyphenols, Nutrients 2 (2010), 1231-1246
15. L. Abaza, A. Taamalli, H. Nsir, M. Zarrouk, Olive Tree (Olea europeae L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds, Antioxidants 4 (2015), 682-698
16. A. Sander, Ekstrakcija, Materijali za kolegij Toplinsko procesno inženjerstvo, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2018)
17. H. Drmić, A.Režek Jambrek, Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croatian Journal of Food Science and Technology 2(2) (2010), 22-33
18. A. Jakšetić, Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz ječma metodom odzivnih površina, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek (2015)
19. E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and their applications, Chemical Reviews 114 (2014), 11060-11082
20. A. Roda, A.A. Marias, A. Paiva, A. R. C. Duarte, Polymer science and engineering using deep eutectic solvents, Polymers 11, 912 (2019)
21. T. Gazivoda Kraljević, Određivanje struktura organskih spojeva, Nastavni teksta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
22. S. H. Omar, Oleuropein in olive and its pharmacological effects, Scientia Pharmaceutica (2010) 78, 133-154
23. D. C. Harris, Quantitative Chemial Analysis, Seventh edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2007, str. 556.
24. F. Rouessac, A. Pouessac, Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2007, str. 5
25. Q. D. Do, A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, Y.-H. Ju, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica, Journal of food and drug analysis 22 (2014) 296-302

8. ŽIVOTOPIS

[redacted] živim u mjestu Sveti Đurđ kod Ludbrega. Nakon završene Druge gimnazije u Varaždinu, 2015. godine upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Kemijsko inženjerstvo. Stručnu praksu odradila sam krajem treće godine fakulteta u ACG Lukaps d.o.o. u Ludbregu, tvrtki koja se bavi proizvodnjom tvrdih želatinskih kapsula.

2018. godine stekla sam titulu univ. bacc. ing. cheming. obranom Završnog rada na temu „Procjena ekonomskog rizika u proizvodnim procesima“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Igora Dejanovića. Diplomski studij upisala sam također na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijske tehnologije i proizvodi. Služim se engleskim jezikom u govoru i pismu te sam tijekom 2020. godine završila tečajeve engleskog jezika u školi stranih jezika *Polyglotte Institute* u Zagrebu te položila B2.1 i B2.2 stupanjeve prema CEF ljestvici.