

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Marija Varga, Marina Varga

**NMR analiza sekoiridoida i flavonoida u
ekstraktu lista masline**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

POPIS KRATICA

ACE	Angiotenzin konvertirajući enzim (engl. <i>Angiotensin-converting enzyme</i>)
ACN	Acetonitril
AcOH	Octena kiselina
AIDS	Stečeni sindrom imunodeficijencije (engl. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
AMPK	Adenozin monofosfat aktivirana protein kinaza (engl. <i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
BCL2	B-stanični limfom 2 (engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BDNF	Moždani neurotrofni čimbenik (engl. <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BRAF	B-Raf protoonkogen, serin/treonin kinaza (engl. <i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>)
cAMP	Ciklički adenozin monofosfat (engl. <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
COSY	engl. <i>Coherence Spectroscopy</i>
COX	Ciklooksigenaza (engl. <i>Cyclooxygenase</i>)
DAD	Detektor s diodnim nizom (engl. <i>Diode Array Detector</i>)
DMSO	Dimetil sulfoksid (engl. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
EtOAc	Etil acetat
EVOO	Ekstra djevičansko maslinovo ulje (engl. <i>Extra Virgin Olive Oil</i>)
FID	engl. <i>Free Induction Decay</i>
GLUT4	Transporter glukoze 4 (engl. <i>Glucose Transporter 4</i>)
HIV	Virus humane imunodeficijencije (engl. <i>Humane Immunodeficiency Virus</i>)
HMBC	engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-performance liquid chromatography</i>)

Hsp90	Protein toplinskog šoka 90 (engl. <i>Heat shock protein 90</i>)
HSQC	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
LC	Tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid chromatography</i>)
LDL	Lipoprotein niske gustoće (engl. <i>Low-Density Lipoprotein</i>)
MeOH	Metanol
MMP	Matriksna metaloproteinaza (engl. <i>Matrix metalloproteinase</i>)
mTOR	engl. <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MS	Masena spektrometrija
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija
ROS	Reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>Reactive oxygen species</i>)
RSD	Relativna standardna devijacija
TMSP	Natrijeva sol 3-trimetilsilil-3,3,2,2-tetradeteriopropionske kiseline (engl. <i>3-trimethylsilyl-3,3,2,2-tetradeteriopropionic acid sodium salt</i>)
TNF- α	Faktor nekroze tumora α (engl. <i>Tumor necrosis factor α</i>)
TOCSY	engl. <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TOF-MS	engl. <i>Time-of-flight mass spectrometry</i>
VEGF	Faktor rasta vaskularnog endotela (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i>)
1D	Jednodimenzijski
2D	Dvodimenzijski
5-LOX	5-lipooksigenaza (engl. <i>5-lipoxygenase</i>)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. List masline.....	1
1.1.1. List masline – otpad iskoristiv u biomedicinske svrhe	1
1.1.2. Fenolni spojevi lista masline.....	1
1.1.2.1. Oleuropein – najprisutniji fenolni spoj.....	1
1.1.2.2. Prisutnost oleokantala i oleaceina u listu masline	3
1.1.2.3. Flavonoidi u listu masline	5
1.1.3. Određivanje fenola lista masline NMR spektroskopijom.....	9
1.1.3.1. NMR spektroskopija	9
1.1.3.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza oleuropeina u listu masline – prednost NMR spektroskopije	11
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Kemikalije.....	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Priprava standardnih otopina	16
3.2.1.1. Priprava standardne otopine internog standarda	16
3.2.1.2. Priprava standardnih otopina oleuropeina.....	16
3.2.1.3. Priprava standardnih otopina oleokantala.....	18
3.2.1.4. Priprava standardnih otopina flavonoida.....	18
3.2.2. Priprava uzoraka za NMR analizu	19
3.2.3. 1D i 2D NMR spektroskopija u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju fenolnih spojeva	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. NMR spektar ekstrakta lista masline	21
4.1.1. Analiza ¹ H NMR spektra ekstrakta lista masline.....	21
4.1.2. Analiza 2D HMBC NMR spektra ekstrakta lista masline	24
4.2. Usporedba NMR otapala – aceton-d ₆ i metanol-d ₄	24
4.3. Sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline	30
4.3.1. Identifikacija oleuropeina u ekstraktu lista masline.....	30
4.3.1.1. ¹ H NMR spektar ekstrakta lista masline.....	30
4.3.1.2. ¹³ C NMR spektar ekstrakta lista masline	32

4.3.1.3. 2D HMBC NMR spektar ekstrakta lista masline	35
4.3.2. Određivanje sadržaja oleuropeina u ekstraktu lista masline	40
4.3.2.1. Baždarni pravci za kvantifikaciju oleuropeina	40
4.3.2.2. ¹ H NMR spektar ekstrakta lista masline	43
4.3.2.3. Validacija metode	44
4.3.2.3.1. Selektivnost	44
4.3.2.3.2. Linearnost	45
4.3.2.3.3. Osjetljivost	46
4.3.3. Određivanje sadržaja oleokantala u ekstraktu lista masline	46
4.3.4. Identifikacija ostalih bioaktivnih fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline	49
4.3.4.1. Identifikacija sekoiridoida u području 9 - 10 ppm	49
4.3.4.2. Identifikacija flavonoida u ekstraktu lista masline	52
5. ZAKLJUČCI	63
6. ZAHVALA	65
7. POPIS LITERATURE	66
8. SAŽETAK	81
9. SUMMARY	82
10. PRILOZI	83

1. UVOD

1.1. List masline

1.1.1. List masline – otpad iskoristiv u biomedicinske svrhe

Olea europea L. često je uzgajana vrsta iz roda Oleaceae na mediteranskom području, ne samo zbog očuvanja tradicije, već i zbog blagodati koje pružaju njezini plodovi u očuvanju zdravlja, a i u konačnici maslinovo ulje dobiveno njihovom preradom (1, 2). Prilikom berbe plodova masline, ali i rezidbom drveća stvara se biljni otpad, među ostalima i lišće, koji ima veliki potencijal u svojoj primjeni u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (3 – 5). Ljekovitost lista masline poznata je još od davnina kada se koristio u liječenju vrućice, malarije, dijabetesa i srčanih oboljenja (6 – 9). Raznim istraživanjima utvrđen je potencijalni farmakološki učinak ekstrakta lista masline. Tako je predloženo da ekstrakt lista masline pokazuje kardioprotektivni učinak kod aritmija i negativnog učinka povišene razine adrenalina, antidijabetski učinak, antialergijsko djelovanje (6), antimikrobni (6, 10, 11), anti-HIV, antifungalni, antiproliferativni, radioprotektivni, gastroprotektivni te neuroprotektivni učinak (11, 12). U mnogobrojnim *in vitro* ispitivanjima potvrđena je antioksidativna aktivnost ekstrakta lista masline (13, 14). Provedena su i određena klinička ispitivanja, pa je tako dokazano da ekstrakt lista masline ostvaruje pozitivne hematološke učinke (15) te pogoduje liječenju metaboličkog sindroma (16). Utvrđeno je kako su za veliki potencijalni medicinski značaj navedenoga odgovorni sekoiridoidi, jednostavni fenoli i flavonoidi (4, 6, 17) koji su prisutni u listu masline, među kojima je najprisutniji, te time i najznačajniji oleuropein (7, 9).

1.1.2. Fenolni spojevi lista masline

1.1.2.1. Oleuropein – najprisutniji fenolni spoj

Oleuropein, kao jedan od pripadnika klase spojeva sekoiridoida, jedan je od najzastupljenijih fenolnih spojeva prisutnih u listu masline (18). Utvrđeno je da je oleuropein, osim u listu, jedna od glavnih fenolnih sastavnica plodova masline (19), a njegova prisutnost dokazana je i u maslinovom ulju (20 – 22) te otpadu stvorenom od plodova masline u procesu proizvodnje maslinovog ulja (23).

Raznim istraživanjima dokazan je kardioprotektivni učinak oleuropeina. Uočena su njegova izrazita antiaterosklerotska svojstva, pokazujući inhibicijski učinak na adheziju monocitoidnih stanica i aktivaciju endotela, koji je rezultat njihovog antioksidativnog i

protuupalnog djelovanja (24). Zabilježeno je da oleuropein posjeduje hipotenzivna svojstva regulirajući povišeni krvni tlak redukcijom sistoličkih i dijastoličkih vrijednosti (25). Također, opaženo je da oleuropein smanjuje koncentraciju lipoproteina niske gustoće (LDL) u plazmi (26). Kardioprotektivna svojstva oleuropeina utvrđena su i u sprječavanju trombocitne agregacije djelujući inhibitorno na cAMP-fosfodiesterazu, koji ima katalitički učinak u ovome procesu, te ublažavanju oštećenja miokarda uzrokovana ishemijskim stresom (24, 27, 28).

Nadalje, velik broj *in vitro* i *in vivo* studija pokazuje kako oleuropein ima izražene terapijske mogućnosti u liječenju tumorskih oboljenja, pa je tako utvrđeno da oleuropein potiče zastoj staničnog ciklusa većeg raspona stanica raka, uključujući raka gušterače, jetre, dojke, pluća i neuroblastoma te time sprječava njihov nekontroliran rast i proliferaciju. Također, pokazano je kako oleuropein u pojedinim tumorskim stanicama djeluje kao agens koji modulira ekspresiju proapoptotskog proteina Bax te ujedno smanjuje učinak proteina koji inhibiraju apoptozu, kao što je BCL-2, pokretanjem apoptotskog puta (7). Zabilježeno je i citotoksično djelovanje oleuropeina na BRAF stanicama melanoma, kao i njegov antimetastatski učinak na stanicama raka dojke regulacijom određenih gena. Potvrđeno je kako se primjenom oleuropeina može smanjiti toksični učinak cisplatina na stanice gušterače i tako smanjiti nuspojave kemoterapije (24).

Na temelju više provedenih istraživanja utvrđeno je da oleuropein ima povoljan učinak na kontrolu glukoze u krvi, pa je tako uočeno da stimulira stanično preuzimanje glukoze aktiviranjem protein kinaze (AMPK), te povećana translokacija transportera glukoze GLUT4 na plazmatsku membranu (24). Također, prema rezultatima istraživanja, dokazano je da oleuropein potiče aktivnost β stanica gušterače na izlučivanje inzulina (26, 29). Potvrđeno je da oleuropein ima antiadipogeni učinak, zbog čega također pokazuje antidijabetička svojstva budući da je pretilost jedan od rizičnih čimbenika u razvoju dijabetesa tipa II (24).

U nizu *in vivo* istraživanja proučavan je neuroprotektivni učinak oleuropeina. Dokazano je da oleuropein smanjuje β -amiloidnu akumulaciju, uz istovremeno poboljšanje kognitivnih performansi povezanih s Alzheimerovom bolešću (25). Utvrđeno je i da aktivira autofagni mehanizam signalnim putem AMPK/mTOR u moždanom tkivu miševa. Uz to, potvrđen je njegov učinak jačanja endogenih antioksidativnih mehanizama i smanjenja razine radioaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Također, opaženo je da oleuropein smanjuje neurodegenerativni potencijal α -sinukleinskih agregata, reducirajući time simptome Parkinsonove bolesti (24).

Brojna biomedicinska istraživanja dokazala su veliki potencijal oleuropeina u prevenciji i liječenju određenih patoloških stanja. Dokazana je *in vitro* antimikrobna aktivnost oleuropeina na vrstama roda *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Escherichia* i *Salmonella* (11, 17) te je time utvrđen potencijal oleuropeina u liječenju raznih infektivnih bolesti izazvanih bakterijama, čije liječenje iz godine u godinu postaje sve teže s obzirom na rastuću rezistenciju na antibiotike (30, 31). Osim bakterijskih, evidentirano je kako bi oleuropein mogao imati ulogu u liječenju gljivičnih infekcija, pa je tako utvrđeno da ima nepovoljan učinak na vrste roda *Cryptococcus* i *Candida* (17). Zabilježeno je kako oleuropein može biti od velikog značaja u liječenju bolesti uzrokovanih virusima budući da je potvrđen njegov antivirusni učinak kod rinovirusa, herpesvirusa i parvovirusa, a posjeduje i značajne terapijske mogućnosti u liječenju AIDS-a jer je dokazano njegovo inhibicijsko djelovanje na ulazak i integraciju virusa HIV u stanice (6).

Značajan je broj istraživanja koja ispituju ljekovita svojstva oleuropeina, čiji obećavajući rezultati otvaraju mogućnosti za primjenu u terapiji određenih bolesti, no svakako je i dalje prijeko potreban veći broj kliničkih studija kako bi se potvrdila njegova ljekovitost.

1.1.2.2. Prisutnost oleokantala i oleaceina u listu masline

Oleokantal (p-HPEA-EDA) i oleacein (3,4 DHPEA-EDA) (32) su, uz oleuropein, jedni od najviše istraženih sekoiridoida koje pronalazimo u vrsti maslina, lat. *Olea europea* L.(9).

Proveden je velik broj istraživanja u kojima je analizirana biološka aktivnost oleokantala. Jedan od njegovih najviše istraženih učinaka jest inhibicija aktivnosti enzima COX-1 i COX-2, zbog čega je u literaturi često uspoređivan s ibuprofenom (9, 33, 34). Dokazano je *in vitro* da oleokantal ima jače inhibicijsko djelovanje od ibuprofena u istim koncentracijama, što ga čini potencijalnim kandidatom za liječenje određenih upalnih stanja, kao što je osteoartritis (24). Nadalje, rastući je broj istraživanja koja ispituju antitumorsko djelovanje oleokantala, pa je tako *in vitro* zabilježeno da potiče apoptozu veliki broj različitih stanica raka (7) te posjeduje izraženu inhibitornu aktivnost prema tumorskom rastu (35, 36). Potvrđeno je da je oleokantal inhibitor Hsp90, čime ometa funkciju onkoproteina u stanicama raka (34, 36). Također, zabilježeno je kako ima sinergistički učinak s lapatinibom, odnosno tamoksifenom, pa bi potencijalna primjena oleokantala u kombinaciji s navedenim citostaticima omogućila manji broj nuspojava uzrokovanih citotoksičnim učinkom istih na zdrave stanice zbog smanjenja njihove uporabne doze. Utvrđen je i neuroprotektivni učinak oleokantala koji se očituje u smanjenju *tau-tau* interakcija i povećanju ekspresije P-

glikoproteina, čime pokazuje potencijal u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što je demencija (24).

Više neovisnih studija ispitalo je ljekoviti učinak oleaceina. Dokazano je da oleacein posjeduje protuupalna svojstva, čime je njegov učinak usporediv indometacinu, s izraženom inhibicijom enzima 5-LOX smanjujući tako stvaranje leukotrijena, medijatora upale. Utvrđena je njegova aktivnost kao ACE inhibitora, koja se očitovala u smanjenju generiranja ROS, čime je istaknut njegov potencijalni antiaterosklerotski učinak. Zabilježeno je kako oleacein posjeduje i protutumorsko djelovanje, koje je slično oleokantalu (24).

Najpoznatija je prisutnost oleokantala i oleaceina u ekstra djevičanskom maslinovom ulju (EVOO) (37). Tijekom procesa proizvodnje maslinovog ulja dolazi do razgradnje oleuropeina i ligstrozida u plodovima masline, prilikom čega enzimski kataliziranom hidrolizom nastaju oleuropein aglikon i ligstrozid aglikon, a potom nizom daljnjih kemijskih reakcija, također u prisutnosti enzima, dolazi do nastanka oleaceina i oleokantala (37, 38). Stoga maslinovo ulje odlikuje relativno visoka koncentracija zadnjih dvaju navedenih sekoiridoida, dok se prisutnost oleuropeina u ulju rijetko navodi (39). Međutim, unatoč tomu što je oleuropein jedan od sekoiridoida prisutnih u najvećoj koncentraciji u listu masline, nema dokaza o razgradnji istoga do strukturno srodnoga oleaceina tijekom skladištenja, odnosno mljevenja lišća masline, a broj istraživanja koji govore o raspadu u postupku izdvajanja bioaktivnih spojeva iz lista masline ograničen je. Zabilježeno je kako određene eksperimentalne metode obrade lista masline mogu dovesti do stvaranja oleaceina u ekstraktu. Papakonstantinou i sur.(35) tvrde kako se oleuropein prevodi do oleaceindiola ekstrakcijom lista masline pomoću vode temperature 15 – 25 °C, nakon čega se navedeni spoj ispiranjem vodenog ekstrakta etil acetatom (EtOAc), odnosno diklormetanom (CH₂Cl₂) prevodi do oleaceina. Pritom se navodi kako je presudno da temperatura vode ne prelazi navedenu kako bi se izbjegla deaktivacija oleuropein glukozidaze, enzima koji katalizira prvu navedenu reakciju. Gutiérrez-Miranda i sur.(40) ponavljaju prethodno navedeni postupak, uz detekciju dobivenog oleaceina NMR-om. Nadalje, iako je u literaturi zabilježena prisutnost ligstrozida u listu masline (39), nema podataka o njegovoj razgradnji do strukturno srodnog oleokantala u bilo kojem postupku obrade ili pohrane lišća masline.

Osim što je stvaranje oleokantala i oleaceina iz svojih prirodnih prekursora rijetko ili nije uopće dokumentirano, u iznimno malom broju istraživanja vršena je i provjera prisutnosti navedenih fenolnih spojeva u listu masline. Cuffaro i sur. (41) u vodenom ekstraktu lista, nakon tehnike pročišćavanja HPLC-om (mobilna faza smjesa H₂O/AcOH (97,5:2,5 v/v) i ACN/MeOH (1:1 v/v)) nisu identificirali oleokantal i oleacein. Također, Mehmood i sur.(42)

u preglednom radu koji se bavi sastavom ekstrakta lišća masline iz određenog opusa literature bilježe kako prisutnost oleaceina i oleokantala nije bila ispitana. Međutim, u nekoliko istraživanja navodi se kako je oleacein prisutan u listu masline (43 – 46). U svim navedenim istraživanjima nije dovedeno u pitanje postoji li mogućnost da je protokol pripreme ekstrakta lista masline, kao i sam postupak razdvajanja bioaktivnih komponenti metodom tekućinske kromatografije, mogao utjecati na konačni fenolni sastav te potencijalni nastanak oleaceina. Na primjer, Hansen i sur.(45) u postupku ekstrakcije koriste vodu, te u tekućinskoj kromatografiji, među ostalim, i diklormetan, čime je vjerodostojnost sastava lista masline upitna ako se uzme u obzir da su, prema prethodno navedenoj literaturi (35), navedena otapala, u tom redoslijedu, služila u dobivanju oleaceina. Gentile i sur.(47) metodom tekućinske kromatografije (u kombinaciji s masenom spektrometrijom), uz oleacein, bilježe i prisutnost oleokantala u ekstraktu lista masline. Prisutnost oleokantala u ekstraktima lista masline na australskom tržištu, no zbog nedostatka informacija o dobivanju i mogućoj obradi samih ekstrakata postoji mogućnost da je i u ovom slučaju oleokantal nastao uslijed postupka obrade lista. Valja istaknuti kako je u istom istraživanju, uz oleokantal, kvantificiran i sadržaj oleaceina u ekstraktu lista masline.

Mali je broj istraživanja koji uspijevaju identificirati oleacein, odnosno oleokantal u ekstraktu lista masline, no upitna je njihova pouzdanost budući da u većini radova mogućnost njihovog nastajanja iz prekursora u postupku obrade lista nije ispitana. Također, osim navedenih radova, nema podataka da je prisutnost navedenih spojeva u ekstraktu lista masline bila ciljno istraživana.

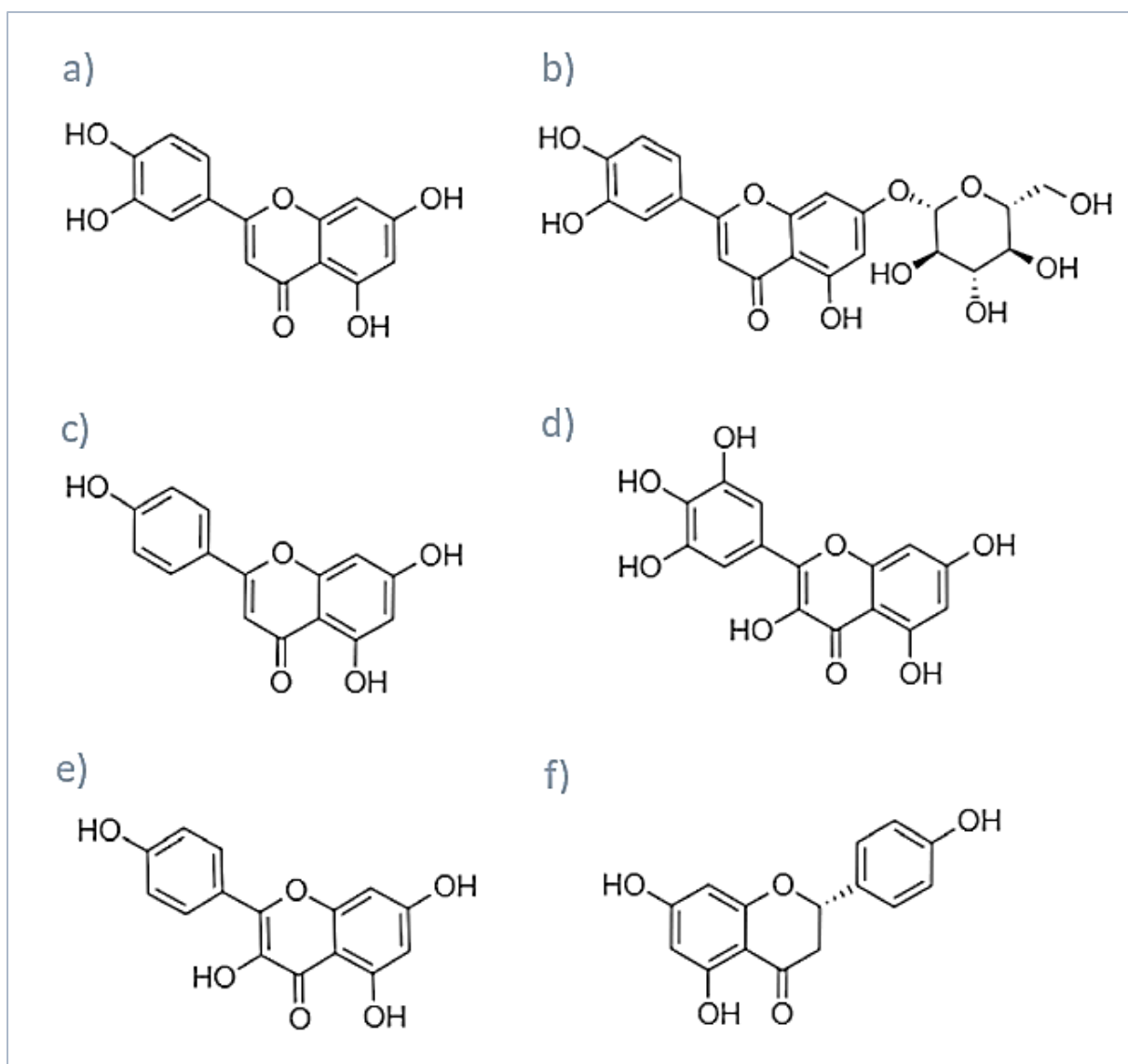
1.1.2.3. Flavonoidi u listu masline

Provedene kvalitativne analize fenolnog ekstrakta lista masline različitih istraživanja pokazale su učestalu prisutnost flavonoida, bioaktivnih spojeva koji strukturno pripadaju polifenolima, a čija je uloga u biljnom svijetu zaštita od nametnika, patogena te štetnog ultraljubičastog zračenja (49, 50). Najčešći flavonoidi lista masline su luteolin i apigenin te njihovi 7-O-glukozidi, luteolin 4'-O-glukozid, kvercetin, rutin i diosmetin, dok je rjeđe zabilježena prisutnost miricetina, kempferola i naringenina (39, 51 – 53).

U velikom broju istraživanja dokazano je kako flavonoidi imaju izraženo antioksidativno djelovanje, čime ostvaruju veliki potencijal u liječenju i prevenciji određenih patoloških stanja (54). Naime, utvrđeno je kako fenolne skupine flavonoida stupaju u

oksidacijsko-redukcijsku reakciju s reaktivnim kisikovim spojevima (engl. *reactive oxygen species*, ROS), prilikom čega nastaju stabilniji radikali, što za posljedicu ima smanjenje oksidativnih oštećenja u organizmu (55, 56). Također, zabilježeno je da flavonoidi sprječavaju apoptozu kardiomiocita tijekom oksidativnog oštećenja te oksidaciju LDL-a, čime imaju zaštitni učinak na kardiovaskularni sustav. Druga potencijalna kardioprotektivna djelovanja flavonoida također su istražena. Tako je predloženo da imaju antihipertenzivni učinak inhibirajući ACE, smanjujući razinu endotelina i povećavajući vazodilataciju posredovanu NO, a potvrđeno je i njihovo antitrombotsko djelovanje pokazujući anagonistički učinak na tromboksan A₂ receptore (56). Zabilježen je i njihov antihipertenzivni učinak, koji se očituje u smanjenju sistoličkog i dijastoličkog tlaka (57). Često utvrđeni učinak flavonoida lista masline jest njihovo protuupalno djelovanje. Velik broj flavonoida interferira u putu nastanka prostaglandina, pa tako, ovisno o kojem je flavonoidu riječ, mogu inhibirati cikloksigenazu i lipooksigenazu, a utvrđen je i njihov antialergijski učinak tako što inhibiraju degranulaciju bazofila (56). Nadalje, uočeno je i neuroprotektivno djelovanje flavonoida, sprječavajući agregaciju A β amiloida i potičući stvaranje BDNF-a (58, 59). Znatan broj istraživanja pokazao je i kako određeni flavonoidi djeluju antikancerogeno. Utvrđeno je kako potiču apoptozu tumorskih stanica modulacijom BCL-2 proteina, te zastoj staničnog ciklusa u G1/G2 fazi staničnog ciklusa (60, 61). Također, dokazan je njihov inhibitorni učinak na VEGF i MMP-ove sprječavajući angiogenezu i metastaziranje tumora (61, 62). *In vivo* je potvrđen i hepatoprotektivni učinak flavonoida, sprječavajući razna inducirana oštećenja jetre (63). Niz istraživanja bilježi i antimikrobnu aktivnost flavonoida, koja se očituje u sprječavanju formiranja biofilma i virulentnih faktora te interferenciji u signalnim putovima bakterija (64).

Za flavonoide lista masline, među ostalim i onih čija je prisutnost u ekstraktu lista masline bila ispitana u ovome istraživanju (**Slika 1**), razna *in vitro* i *in vivo* istraživanja dokazuju kako većina posjeduje sve temeljne učinke prethodno navedene (**Tablica 1**).



Slika 1. Kemijska struktura a) luteolina, b) luteolina 7-O-glukozida, c) apigenina, d) miricetina, e) kempferola i f) naringenina.

Tablica 1. Kratki pregled bioloških učinaka flavonoida lista masline.

	Antioksidativni učinak	Protuupalni učinak	Kardioprotektivni učinak	Antidijabetički učinak	Neuroprotektivni učinak	Antitumorski učinak	Hepatoprotektivni učinak	Antimikrobni učinak
luteolin*	(65) (66) (67)	(65) (66) (68) (69)	(65) (66) (70) (71)	(65) (72)	(66)	(65) (66) (73)	(74) (75)	(76)
luteolin 7-O-glukozid *	(65)	(65) (68) (77)	(65)	(72)	(78) (79)	(65) (77)		(79)
luteolin 4'-O-glukozid	(80)	(81)				(82)		(83)
apigenin *	(84) (85) (67) (86)	(84) (85) (86)	(84) (85)	(84) (85) (86)	(84) (85)	(84) (85) (86)	(87)	(88)
apigenin 7-O-glukozid	(89)	(89)		(90)	(91)	(92)		(79)
kvercetin	(93) (94)	(93) (94)	(93) (94)	(93) (94)	(93) (94)	(93) (94)	(93) (94)	(93) (94)
rutin	(95)	(95)	(96)	(95)	(97)	(95)	(98)	(99)
diosmetin	(100)		(101)		(102)	(103)	(104)	
miricetin *	(105) (106)	(105) (106)	(105)	(105)	(105) (106)	(105) (106)	(107)	(105)
naringenin*	(108) (109)	(108) (109)	(108)	(108) (109)	(108) (109)	(108) (109)	(110)	(111)
kempferol*	(112)	(112) (113)	(112) (113)	(112)	(112) (113)	(112) (113)	(114)	(115)

*flavonoidi čija je prisutnost u listu masline bili predmet ovoga istraživanja

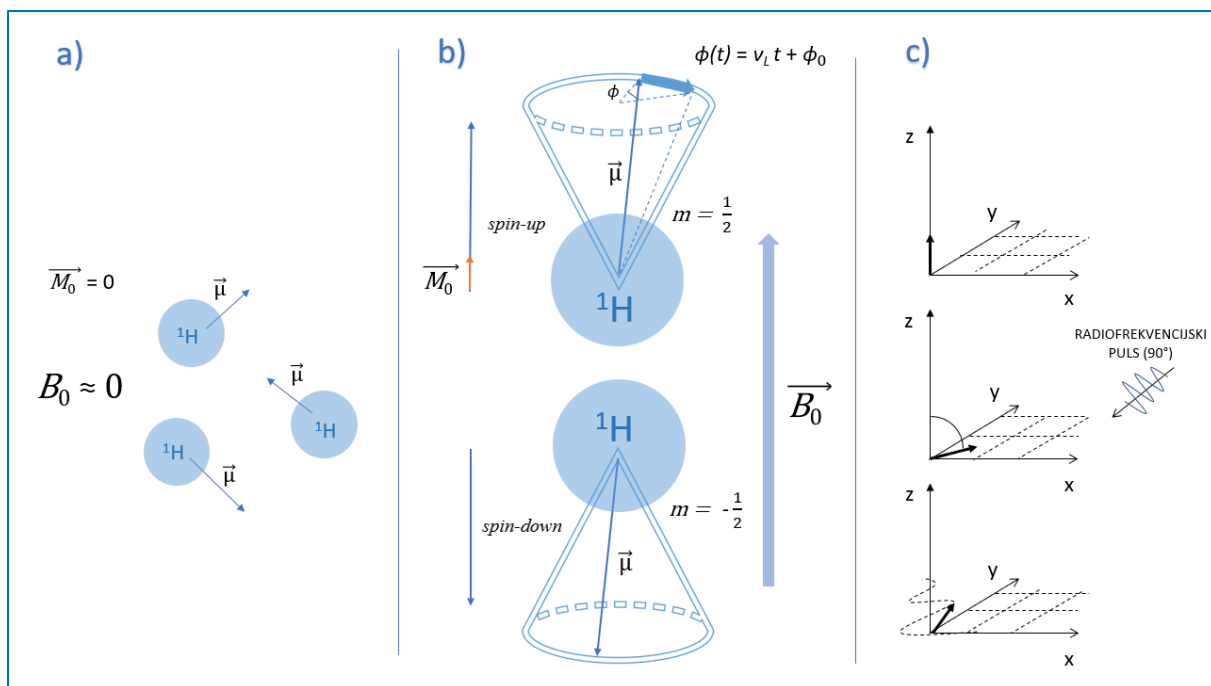
1.1.3. Određivanje fenola lista masline NMR spektroskopijom

1.1.3.1. NMR spektroskopija

NMR spektroskopija jedna je od najčešće korištenih analitičkih metoda u području kemije, biokemije, farmacije te u medicinskoj dijagnostici. Osnovni princip NMR-a temelji se na interakciji jezgara koje imaju spinski kvantni broj različit od 0 ($I \neq 0$) u vanjskom magnetskom polju s radiofrekvencijskim zračenjem. Naime, uvođenjem vanjskog magnetskog polja dolazi do Zeemanovog cijepanja, odnosno uklanjanja degeneriranosti orijentacijskih stanja spina, te raspodjele populacije jezgara između diskretnih energetske stanja. Protonske (^1H) jezgre ($I = \frac{1}{2}$) imaju dva spinska stanja različite energije, *spin-up* (stanje manje energije) i *spin-down* (stanje veće energije), pri čemu je nešto veća napučenost populacije u nižem energetskom stanju prema Boltzmannovoj raspodjeli. Razlika energije između energetskih razina proporcionalna je primijenjenom magnetskom polju, a opisuje se Larmorovom frekvencijom. Definirana je jednadžbom:

$$\Delta E = \hbar \nu_L$$

gdje je ΔE razlika energije između energetskih razina, $\hbar$ reducirana Planckova konstanta i ν_L Larmorova frekvencija. Ovisno o kemijskoj okolini, protoni će imati različitu Larmorovu frekvenciju budući da proton „osjeća“ različito magnetsko polje ovisno o tome u kakvom kemijskom okruženju se nalazi, što će se u spektru manifestirati kao različit kemijski pomak signala. Primjenom radiofrekvencijskog pulsa, koji je po iznosu jednak Larmorovoj frekvenciji, inducira se prijelaz jezgri iz nižeg u više energetske stanje. Završetkom primjene pulsa, jezgre se vraćaju u ravnotežno stanje, prilikom čega se stvara FID signal koji se matematičkom Fourierovom transformacijom pretvara u spektar – ovisnost intenziteta signala o frekvenciji. Intenzitet signala, među ostalim, proporcionalan je broju protona koji sudjeluju u stvaranju signala, što otvara mogućnost kvantifikacije spoja u uzorku (116) **(Slika 2)**.



Slika 2. Prikaz a) ^1H protona u odsutnosti vanjskog magnetskog polja ($B_0 \approx 0$), prilikom čega je zbog degeneriranosti orijentacijskih stanja spinova neto magnetizacija ($\overline{M}_0$) jednaka 0; b) precesije spina ^1H protona u nižem (*spin-up*) i višem (*spin-down*) energetsom stanju u vanjskom magnetskom polju (B_0) Larmorovom frekvencijom (ν_L), prilikom čega je neto magnetizacija ($\overline{M}_0$) u smjeru vanjskog magnetskog polja; c) zaokretanja vektora magnetizacije prema transverzalnoj ravnini primjenom radiofrekvencijskog pulsa, što stvara mjerljiv NMR signal.

Popriličan je broj istraživanja u kojemu je kvalitativna analiza fenolnih spojeva karakterističnih za vrstu maslina, lat. *Olea europea* L. provedena metodom ^1H NMR spektroskopije. Velik dio njih bavi se utvrđivanjem fenolnog sastava maslinovog ulja (117). Tako Christophoridou i sur.(118) ^1H NMR spektroskopijom analiziraju fenolni ekstrakt maslinovog ulja bez odvajanja njegovih sastavnica, u kojemu pomoću karakterističnih pikova identificiraju pojedine sekoiridoide i flavonoide maslinovog ulja, među kojima su i oleuropein utvrđen pomoću singleta i kvarteta na 5,90 – 6,00 ppm, oleokantal i oleacein pomoću dubleta na 9,20 i 9,54 ppm te luteolin i apigenin pojavom dubleta redom na ~7,42 i 7,94 ppm. Ipak, primjetno je češća praksa u literaturi prethodno odvajanje izoliranih fenola tehnikom tekućinske kromatografije, a potom njihova identifikacija ^1H NMR spektroskopijom. Vršanjem ovakve analize otklanja se mogućnost preklapanja pikova više spojeva, što olakšava identifikaciju pojedinog spoja. Na ovaj način identificirani su, osim u maslinovom ulju, i fenoli plodova masline, zatim biljnog otpada stvorenog od plodova u procesu dobivanja maslinovog ulja, te lista masline (119 – 123). Također, uporabom ove analitičke tehnike

pojedina istraživanja utvrđuju razlike u kemijskom profilu maslinovog ulja između određenih sorti masline ili geografskih područja uzgajanja sorte (124 – 126). Nadalje, u svrhu određivanja molekulske strukture novoizoliranih fenolnih spojeva, a često i sigurnije identifikacije već poznatih spojeva, u određenom broju istraživanja provedena je i 2D NMR analiza (najčešće HSQC, HMBC, COSY i TOCSY) pojedinog fenola (123, 127), a u pojedinim slučajevima i fenolnog ekstrakta maslinovog ulja (118, 128, 129) te lista masline (130). Uz kvalitativnu analizu maslinovog ulja pojedinih sorti masline, u određenom broju istraživanja određen je i ukupni fenolni sadržaj navedenog uzorka ^1H NMR spektroskopijom (131). Međutim, sve je veći broj radova koji kvantificiraju pojedini fenol prisutan u maslinovom ulju rabeći ^1H NMR spektroskopiju. Karkoula i sur.(132) odredili su koncentraciju oleokantala i oleaceina u uzorku maslinovog ulja integracijom karakterističnog signala navedenih spojeva i internog standarda, a isti postupak ponovili su Kugić i sur.(133) primijenivši ga na maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline. Za razliku od maslinovog ulja, sadržaj oleuropeina u ekstraktu lista masline iznimno je rijetko određen metodom ^1H NMR spektroskopije, što je detaljnije objašnjeno u 1.1.3.2.

1.1.3.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza oleuropeina u listu masline – prednost NMR spektroskopije

Identifikacija oleuropeina, ali i drugih fenolnih spojeva poput flavonoida, u listu masline vrlo je često provedena metodom HPLC-MS (LC-MS), koja uključuje analizu uzorka metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i identifikaciju odvojenih komponenti uzorka metodom masene spektrometrije (12, 134, 135). Prisutnost oleuropeina u ekstraktu lista masline često je utvrđena i metodom HPLC-DAD/UV (136, 137). Budući da je oleuropein jedan od najčešće identificiranih spojeva u kvalitativnoj analizi fenolnih spojeva ekstrakta lista masline, velik je broj istraživanja u kojima je, uz prethodnu identifikaciju, određena i koncentracija oleuropeina u ekstraktu lista masline. Sadržaj oleuropeina u ekstraktu vrlo je često određen metodom HPLC-MS (LC-MS). Koncentracija oleuropeina u ekstraktu lista masline u sedam odabranih istraživanja, u kojima je korištena navedena metoda, bila je u rasponu 0,59 – 441 mg/g suhog ekstrakta (47, 138 – 143), s medijanom u iznosu od 10,04 mg/g suhog ekstrakta. Metoda koja se također koristila za određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktu lista masline jest HPLC-DAD/TOF-MS (12, 135), koja je u navedenim istraživanjima iznosila ~ 2 mg/g suhog ekstrakta. U literaturi je navedeno

kako sadržaj oleuropeina u ekstraktu, a time posljedično i u listu masline, ovisi o mjesecu u kojemu su listovi brani, sorti masline i geografskom području maslinika (144 – 146).

Kao što je već prikazano u 1.1.3.2., jedna od čestih metoda kvalitativne, a sve češće i kvantitativne analize fenolnih spojeva jest metoda NMR spektroskopije. NMR spektroskopija u odnosu na tekućinsku kromatografiju ima određene prednosti koje se tiču same izvedbe postupka. Jedna od njih jest uporaba znatno manje količine otapala. Iako potrebni volumen otapala za pripravu mobilne faze u tekućinskoj kromatografiji ovisi o više čimbenika, kao što su vrsta odvajanja, volumen kolone i brzina tečenja, najčešće zahtijeva uporabu otapala koji se količinom može mjeriti u volumenu od 10 do 20 kolona (147). Gradijentna HPLC kromatografija, koja je u svrhu identifikacije oleuropeina češće korištena od izokratske, uključuje promjenu sastava mobilne faze tijekom izvođenja, zbog čega predviđa potrošnju otapala koja se može mjeriti u volumenu od 20 do 30 kolona (147). Za razliku od toga, u NMR spektroskopiji troše se tek manje količine otapala s obzirom da se koristi 5 mm NMR tuba koja zahtijeva 0,6 do 0,7 mL deuteriranog otapala (148). Također, analizu uzorka metodom NMR spektroskopije odlikuje kraće trajanje postupka u odnosu na analizu provedenu metodom HPLC kromatografije, s obzirom da potonja uključuje odvajanje sastavnica uzorka.

Unatoč prednostima NMR spektroskopije, u ograničenom je broju istraživanja identifikacija i/ili kvantifikacija oleuropeina u ekstraktu lista masline provedena ovom analitičkom tehnikom (130, 149 – 155). Većina navedenih istraživanja prvotno je provela separaciju komponenti ekstrakta lista masline, a potom odvojeni oleuropein visoke čistoće identificirala metodom ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije, dok je kvantitativna analiza sadržaja oleuropeina provedena metodom tekućinske kromatografije. Tek je manji broj istraživanja u kojima je isključivo metodom NMR spektroskopije, uz identifikaciju oleuropeina istom metodom, određen i sadržaj ovoga spoja u ekstraktu lista masline. Tako su Charisiadis i sur.(130, 149) za određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktu lista masline ^1H NMR spektroskopijom koristili integral C-5' OH i C-6' OH singleta oleuropeina na $\sim 8,8$ ppm u DMSO- d_6 , prilikom čega je korišten TMSP- d_4 kao interni standard za kvantifikaciju. S obzirom da je riječ o labilnim protonima koji su podložni izmjeni s drugim protonima u kemijskoj okolini, pikovi navedenih singleta često su prošireni ili čak odsutni u ^1H NMR spektru, zbog čega je u navedenom istraživanju korištena pikrinska kiselina. Međutim, kako navode, povoljna rezolucija pikova postiže se u vrlo uskom molarnom omjeru pikrinske kiseline i mjenog polifenola (oleuropeina), zbog čega relativno mala razlika u količini dodane pikrinske kiseline može znatno utjecati na izgled spektra. Također, sama uporaba

pikrinske kiseline zbog svoje eksplozivnosti i toksičnosti zahtijeva veće mjere opreza pri radu (156). Koncentracija oleuropeina u ekstraktu lista utvrđena NMR spektroskopijom evaluirana je usporedbom s koncentracijom istoga spoja određenom metodom HPLC-a u istom uzorku, prilikom čega je utvrđeno kako postoji relativno malo odstupanje u ispitanim vrijednostima. Kontogianni i sur.(152) primjenjuju isti postupak te također određuju sadržaj oleuropeina u usporedbi s HPLC-om. Koncentracija oleuropeina u ekstraktu lista masline u navedenim radovima utvrđena ^1H NMR spektroskopijom iznosila je ~ 37 (152), odnosno ~ 390 (130, 149) mg/g suhog ekstrakta.

Osim navedenoga, nema drugih dostupnih podataka u literaturi o kvantitativnom određivanju oleuropeina u ekstraktu lista masline ^1H NMR spektroskopijom. Određivanje sadržaja navedenog spoja metodom ^1H NMR spektroskopije proveli su jedino još Mousouri i sur.(157) te Koudounas i sur.(158), koji su odredili koncentraciju oleuropeina u plodovima masline integracijom karakterističnog pika na $\sim 5,9$ ppm, te korištenjem siringaldehida kao internog standarda.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

List masline, iako otpadni biljni materijal, sadrži obilje fenolnih spojeva s izraženim biološkim djelovanjem. Oleuropein, jedan od najzastupljenijih fenolnih spojeva u listu masline, odlikuje se velikim potencijalom u prevenciji i liječenju određenih bolesti (159). Shodno tome, ističe se važnost razvijanja metoda kojima bi se omogućilo određivanje njegova sadržaja u listu masline. HPLC tehnika standardni je pristup kvantitativnog određivanja oleuropeina u ekstraktu lista masline (134, 136). Unatoč prednostima u pogledu potrošnje otapala i vremenskog trajanja, iznimno je malo istraživanja u kojima je ^1H NMR spektroskopijom kvantificiran oleuropein u ovom biljnom materijalu (130, 149, 152). Glavni cilj ovoga rada jest odrediti sadržaj oleuropeina u ekstraktu lista masline ^1H kvantitativnom NMR spektroskopijom. U tu svrhu prvo će se identificirati oleuropein u ekstraktu usporedbom sa standardom uz primjenu ^1H i 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektroskopije. Nadalje, razvit će se analitička metoda za kvantifikaciju oleuropeina u ekstraktu lista masline, u okviru čega će se će se utvrditi otapalo s boljim karakteristikama za ^1H NMR analizu, uspoređujući aceton- d_6 i metanol- d_4 , NMR otapala koja dosad nisu primijenjena u određivanju sastava ekstrakta lista masline. U prethodnim istraživanjima uglavnom je korišten DMSO. Izradit će se baždarni pravci sa standardnim otopinama oleuropeina i uz primjenu internog standarda. U konačnici će se provesti validacija metode.

Nadalje, oleokantal i oleacein izrazito su biološki aktivni fenolni spojevi karakteristični za maslinovo ulje (37). Njihov nastanak povezan je s procesom proizvodnje ulja, prilikom čega nizom reakcija dolazi do razgradnje njihovih prirodnih prekursora, redom ligstrozida i oleuropeina (38). Utvrđena je i mogućnost njihova nastanka iz istih prekursora prilikom obrade lista masline, no broj je takvih istraživanja ograničen (35, 40). Postoji nekoliko radova u kojima je utvrđena prisutnost oleokantala i oleaceina u ekstraktu lista masline. Dodatni je cilj ovoga istraživanja ^1H NMR spektroskopijom utvrditi prisutnost oleokantala i oleaceina u ekstraktu lista masline. Utvrđivanje prisutnosti oleokantala temeljit će se na usporedbi s ^1H spektrom otopine standarda. O prisutnosti oleaceina u listu masline zaključit će se na osnovi literaturnih podataka o kemijskom pomaku pikova oleaceina.

U fenolnom sastavu lista masline redovito su prisutni flavonoidi, bioaktivni spojevi izrazitog antioksidativnog učinka (55). Jedna od najčešćih analitičkih tehnika korištenih u identifikaciji flavonoida ekstrakta lista masline jest LC-MS, dok je kvalitativna analiza ekstrakta lista masline ^1H NMR spektroskopijom, bez pomoćne HPLC metode kojom dolazi

do odvajanja smjese flavonoida, vrlo rijetko korištena u svrhu identifikacije navedenih spojeva (130, 149, 152). Stoga je u cilju ovoga rada bilo i identificirati određene flavonoide koji su, prema literaturi, već pronađeni u sastavu lista masline. U sklopu toga utvrdit će se mogu li se flavonoidi, čiji pikovi imaju sličan položaj u spektru, pouzdano identificirati metodom ^1H spektroskopije, odnosno dolazi li do preklapanja pikova flavonoida sličnog kemijskog pomaka u ^1H NMR spektru smjese flavonoida. Pripravit će se smjese standarda flavonoida, čiji će ^1H NMR spektri biti uspoređeni s ^1H NMR spektrom pojedinog flavonoida. S obzirom na dobivene rezultate, nadalje će se ^1H NMR spektroskopijom utvrditi prisutnost odabranih flavonoida prisutnih u ekstraktu lista masline: luteolina, luteolina 7-O-glukozida, apigenina, naringenina, miricetina i kempferola (39, 51 – 53).

1. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Acetonitril (za HPLC), metanol (za HPLC), aceton-d6 (99%), metanol-d4 (99%) i aceton (*p.a.*) pribavljeni su od tvrtke Merck (Njemačka). Oleuropein (*p.a.*), kempferol (*p.a.*) i naringenin (*p.a.*) nabavljeni su od tvrtke Extrasynthèse S.A. (Francuska), luteolin (*p.a.*), luteolin-7-glukozid (*p.a.*), luteolin-6-glukozid (*p.a.*) i miricetin (*p.a.*) od tvrtke TransMIT GmbH (Njemačka), apigenin (*p.a.*) od tvrtke Fluka Chemie GmbH (Švicarska), oleokantal (*p.a.*) od tvrtke PhytoLab GmbH & Co. KG (Njemačka) te siringaldehid (*p.a.*) od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava standardnih otopina

3.2.1.1. Priprava standardne otopine internog standarda

Standardna otopina internog standarda, siringaldehida, koncentracije $\sim 0,02 \text{ mol/dm}^3$, pripremljena je otapanjem odgovarajuće mase krutine u acetonitrilu. Otopina je čuvana pri temperaturi od -18°C i bila minimalno izložena kisiku i svjetlosti.

3.2.1.2. Priprava standardnih otopina oleuropeina

Otopina standarda oleuropeina u acetonitrilu koncentracije $0,0037 \text{ mol/dm}^3$ pripravljena je otapanjem $0,0010 \text{ g}$ oleuropeina u odmjerne tikvici od 5 mL . Otopina standarda čuvana je pri temperaturi od -18°C u uvjetima bez pristupa svjetlosti i kisika.

Pripravljeno je sedam uzoraka oleuropeina koristeći standardnu otopinu oleuropeina ($c = 0,0037 \text{ mol/dm}^3$) u svrhu izrade baždarnih pravaca za određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktu lista masline. Uzorci su pripremljeni dodavanjem određenog volumena otopine standarda oleuropeina u Eppendorf epruvete, te je u svaku potom dodano $140 \mu\text{L}$ standardne otopine siringaldehida ($c = 0,0200 \text{ mol/dm}^3$). Sadržaj je isparen do suha, a tijekom cijelog postupka uzorci su bili minimalno izloženi svjetlosti i kisiku. Do snimanja NMR spektroskopijom uzorci su čuvani na temperaturi od -18°C .

Raspon koncentracija oleuropeina u pripremljenim uzorcima bio je 0,2 – 6,6 mmol/dm³ u 700 μ L acetona-d₆, pri čemu je koncentracija internog standarda (siringaldehida) uvijek iznosila 4 mmol/dm³. Uzorci navedenog raspona služili su za izradu Baždarnog pravca 1. Nakon što je snimljen pojedini uzorak pripremljen za izradu Baždarnog pravca 1, uzeta je desetina (70 μ L) otopine snimljenog uzorka i dodano 630 μ L acetona-d₆ (ukupni volumen jednak je 700 μ L) te je tako pripremljeni uzorak dan na ¹H NMR snimanje. Na taj način omogućena je izrada još jednog baždarnog pravca (Baždarni pravac 2), čije su koncentracije oleuropeina deset puta manje (raspona 0,02 – 0,66 mmol/dm³), kao i koncentracija internog standarda (0,4 mmol/dm³) u 700 μ L acetona-d₆ (**Tablica 2**).

Tablica 2. Priprava uzoraka za izradu baždarnih pravaca.

<i>Baždarni pravac 1</i>		<i>Baždarni pravac 2</i>
<i>c (oleuropein) / mmoldm⁻³</i>	<i>V (0,0037 moldm⁻³ otopine oleuropeina) / μL</i>	<i>c (oleuropein) / mmoldm⁻³</i>
0,20	38	0,020
0,89	170	0,089
1,45	275	0,145
2,58	490	0,258
3,05	580	0,305
3,68	700	0,368
6,58	1250	0,658

U snimljenim ¹H NMR spektrima uzoraka za izradu baždarnih pravaca integriran je pik oleuropeina na 5,95 ppm i pik internog standarda na 9,83 ppm. Izračunan je omjer njihovih površina $P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$. Prikazana je ovisnost $P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$ o koncentraciji oleuropeina, čime su dobiveni baždarni pravci za određivanje sadržaja oleuropeina u ekstraktu lista masline (Baždarni pravac 1 i Baždarni pravac 2).

3.2.1.3. Priprava standardnih otopina oleokantala

Standardna otopina oleokantala u acetonitrilu pripremljena je iz krutog standarda mase 5,30 mg. Navedeni standard viskozna je tekućina koja je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 5 mL otapanjem u acetonitrilu. Kvantitativnost postupka i stabilnost sadržaja praćena je pomoću UV-VIS spektrofotometrije. Pripravljena je standardna otopina oleokantala koncentracije $0,0035 \text{ mol/dm}^3$. Otopina je čuvana u uvjetima bez pristupa svjetlosti i kisika na -18°C .

Uzorak pripravljen od standardne otopine oleokantala ($c = 0,0035 \text{ mol/dm}^3$) priređen je dodatkom $250 \mu\text{L}$ otopine standarda u Eppendorf epruvetu, u koju je zatim dodano $140 \mu\text{L}$ internog standarda ($c = 0,0200 \text{ mol/dm}^3$). Tako pripravljeni uzorak isparen je do suha te je do NMR analize bio pohranjen pri temperaturi od -18°C , u uvjetima bez pristupa svjetlosti i kisika.

3.2.1.4. Priprava standardnih otopina flavonoida

Koristeći komercijalno dostupne standarde pripremljena je po jedna standardna otopina pojedinog flavonoida u acetonu. Pripremljene su standardne otopine: $0,0034 \text{ mol/dm}^3$ luteolina ($0,0049 \text{ g}$), $0,0027 \text{ mol/dm}^3$ apigenina ($0,0036 \text{ g}$), $0,0034 \text{ mol/dm}^3$ kempferola ($0,0048 \text{ g}$) i $0,0032 \text{ mol/dm}^3$ naringenina ($0,0043 \text{ g}$) otapanjem krutog standarda u odmjernoj tikvici od 5 mL. Otopina standarda miricetina u acetonu koncentracije $0,0053 \text{ mol/dm}^3$ pripremljena je ultrazvučnim otapanjem $0,0085 \text{ g}$ standarda u odmjernoj tikvici od 5 mL u trajanju od oko 1 min. Standardi luteolin 7-O-glukozida ($0,0029 \text{ g}$) i luteolin 6-C-glukozida ($0,0034 \text{ g}$), otopljeni su u acetonu (5 mL) uz primjenu ultrazvučne kupelji, prilikom čega se sva izvagana masa nije otapala u 5 mL acetona, te je nastala suspenzija. Sve otopine flavonoida bile su minimalno izložene kisiku i svjetlosti te su čuvane pri temperaturi od -18°C .

Od standardnih otopina luteolina ($c = 0,0034 \text{ mol/dm}^3$), apigenina ($c = 0,0027 \text{ mol/dm}^3$), miricetina ($c = 0,0053 \text{ mol/dm}^3$), kempferola ($c = 0,0034 \text{ mol/dm}^3$) i naringenina ($c = 0,0032 \text{ mol/dm}^3$) te pripravljenih suspenzija luteolin 7-O-glukozida i luteolin 6-C-glukozida pripremljeni su uzorci koji su se sastojali od samo jednog flavonoida i uzorci u kojima je prisutno više različitih flavonoida. Tako je pripremljena smjesa: luteolina i apigenina; luteolina, luteolina 7-O-glukozida i luteolina 6-C-glukozida; luteolina, luteolina 7-O-

glukozida, luteolina 6-C-glukozida i apigenina; naringenina i miricetina; naringenina, miricetina i kempferola. U svaki uzorak dodano je 139 μL standardne otopine internog standarda ($c = 0,0201 \text{ mol/dm}^3$). Svi uzorci ispareni su do suha vakuumskim uparivačem te su do NMR mjerenja bili čuvani u uvjetima bez pristupa svjetlosti i kisika pri temperaturi od -18°C . Neposredno prije mjerenja, suhom ostatku dodano je 700 μL acetona- d_6 koji je korišten kao NMR otapalo.

3.2.2. Priprava uzoraka za NMR analizu

Uzorci za NMR analizu pripremljeni su otapanjem suhih ekstrakata neposredno prije snimanja spektara. Tijekom pripreme suhih ekstrakata (160), odnosno prije isparavanja ekstrakcijskog otapala (80% etanol), dodano je 139 μL standardne otopine internog standarda ($c = 0,0201 \text{ mol/dm}^3$). NMR uzorci su do snimanja čuvani pri temperaturi od -18°C , u uvjetima bez pristupa svjetlosti i kisika. U svrhu kvalitativne NMR analize otopljeni su u 700 μL acetona- d_6 ili metanola- d_4 .

U svrhu kvantitativne analize oleuropeina izabrane su dvije vrste lista masline u duplikatu. Pripremljeni su suhi ekstrakti A1 i A2 od jedne vrste lista masline, te B1 i B2 od druge vrste lista masline (160). U suhi ekstrakt postupno je dodavan aceton, prilikom čega je svaki put, prije novog dodatka otapala, otopljeni sadržaj kvantitativno prenesen u suhu tikvicu. U ekstrakt je dodavan aceton sve dok se posljednjim dodatkom acetona ekstrakt (zeleno-smeđi talog na stijenci tikvice) vidno nije više otapao u acetonu. Taj posljednji sadržaj također je kvantitativno prenesen u tikvicu. Ukupni volumen dodanog acetona iznosio je 6,50 mL. Iz tikvice je uzet alikvot od 700 μL , u koji je potom dodano 139 μL standardne otopine internog standarda ($c = 0,0201 \text{ mol/dm}^3$) te isparen do suha – „NMR uzorak 1“. Provedena je provjera kvantitativnog prenošenja oleuropeina iz suhog ekstrakta u NMR uzorak. Na stijenkama tikvice je i dalje zaostao bijeli talog. U „zaostali ekstrakt“ postupno je dodavan metanol sve dok sav „zaostali ekstrakt“ nije kvantitativno prenesen metanolom u suhu tikvicu. Ukupni volumen metanola iznosio je 6,50 mL, a sam postupak praćen je UV-VIS spektrofotometrijom. Iz tikvice je uzet alikvot od 700 μL , u koju je potom dodano 139 μL standardne otopine internog standarda ($c = 0,0201 \text{ mol/dm}^3$) te isparen do suha – „NMR uzorak 2“. Uzorci su bili minimalno izloženi kisiku i svjetlosti te do NMR analize bili čuvani pri temperaturi od -18°C . ^1H NMR spektar „NMR uzorka 2“ sadržavao je signal oleuropeina na 5,95 ppm vrlo slabog intenziteta, čime je potvrđena kvantitativnost metode (**Prilog 1**).

3.2.3. 1D i 2D NMR spektroskopija u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju fenolnih spojeva

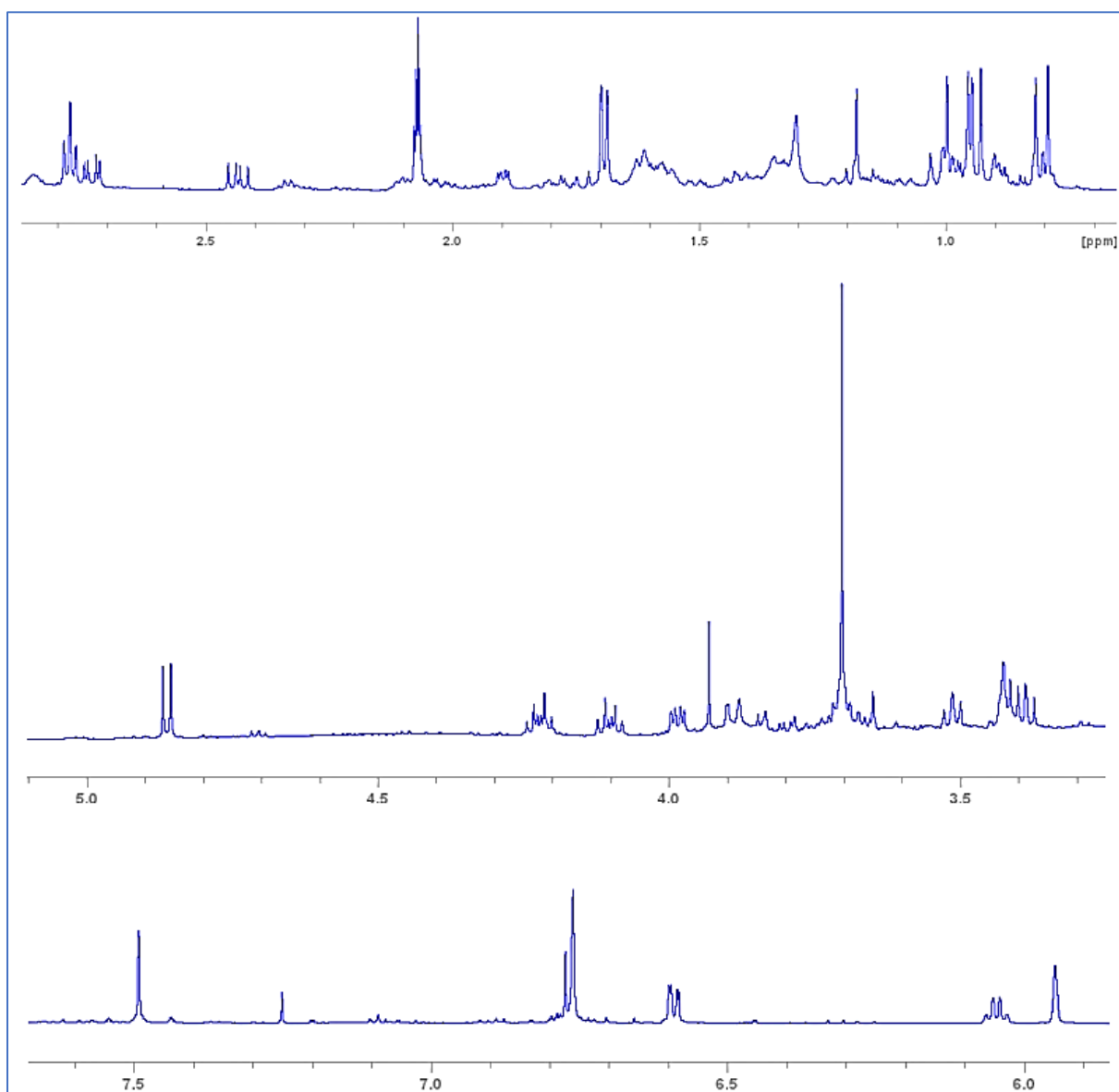
^1H NMR spektri suhих ekstrakata lista masline snimljeni su na uređaju Bruker Avance 600 (14,1 T) na Institutu Ruđer Bošković (Centar za NMR) pri frekvenciji od 600,13 MHz i temperaturi 298 K. Korišteni akvizicijski parametri bili su: spektralna širina 0 – 21 ppm, vrijeme akvizicije = 1,30 s, vrijeme relaksacije ($D1$) = 5 s, pulsni kut = 90° , broj skeniranja (NS) = 64. Prikupljeno je 32 800 podataka. ^1H - ^{13}C HMBC spektri snimljeni su na istom uređaju, pri 298 K, uz akvizicijske parametre: spektralna širina 0 – 15 ppm (^1H) i 0 – 240 ppm (^{13}C), vrijeme akvizicije u trajanju od 0,11 s ($F2$) i 0.01 s ($F1$), vrijeme relaksacije ($D1$) = 1,0 s, broj skeniranja (NS) = 46, 90° duljina pulsa za ^1H ($P1$) = 9,0 μs , vrijeme odgode za udaljenu J -spregu postavljeno na nJ (^1H - ^{13}C) = 145 Hz, ukupno vrijeme akvizicije $\approx$ 4 h. Spektri su obrađeni u programu Bruker TopSpin 4.4.1.

4. REZULTATI I RASPRAVA

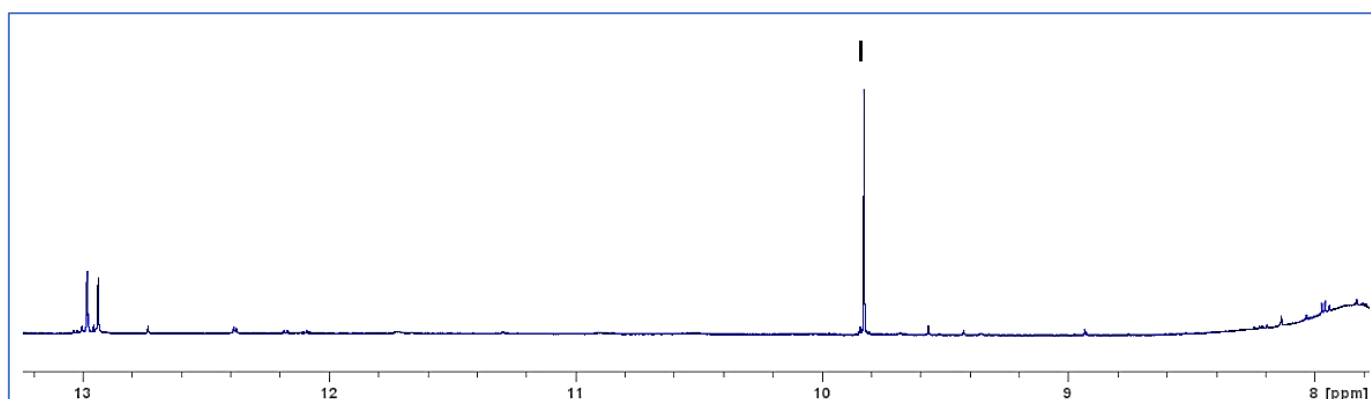
4.1. NMR spektar ekstrakta lista masline

4.1.1. Analiza ^1H NMR spektra ekstrakta lista masline

U svrhu kvalitativne i kvantitativne analize fenolnih spojeva u ekstraktima lista masline, snimljeni su ^1H NMR spektri ekstrakata u acetonu- d_6 . U spektrima snimljenih ekstrakata mogli su se uočiti pikovi u većem dijelu spektralne širine, najčešće 0 – 14 ppm. Većina pikova bila je u području 1 – 4 ppm (**Slika 3**), dok je područje s kemijskim pomakom većim od 8 ppm sadržavalo relativno mali broj pikova (**Slika 4**).

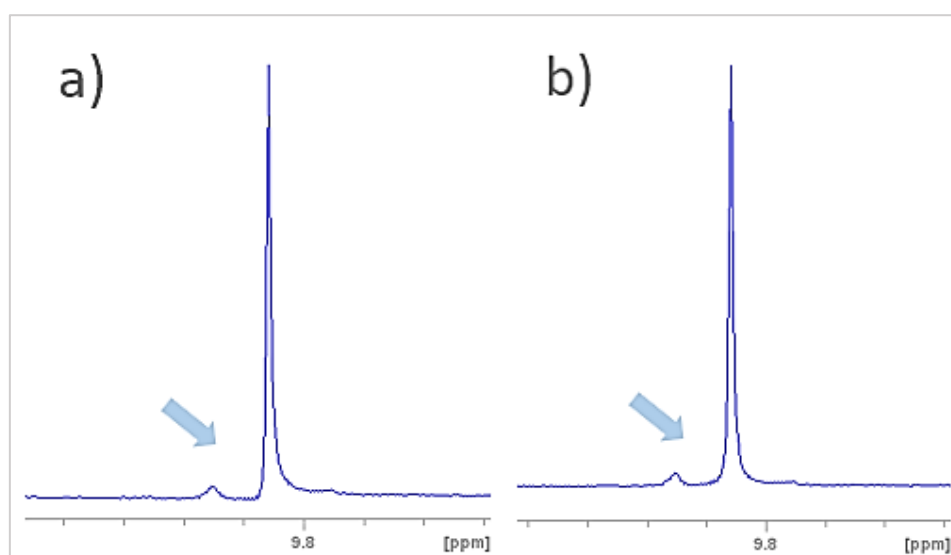


Slika 3. Prikaz ^1H NMR spektra ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 (0 – 7,5 ppm).



Slika 4. Prikaz ^1H NMR spektra ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 (8 – 13 ppm). Oznakom I označen je signal internog standarda.

Zbog tehničkih ograničenja, prilikom snimanja može doći do faznih pomaka frekvencijskih signala u FID-u (engl. *free induction decay*) (161). U svrhu pravilnog integriranja pojedinih signala, potrebno je izvršiti korekciju faze kako bi svi signali sadržavali samo apsorpcijsku komponentu, bez one disperzijske, tj. od važnosti je da su signali za spojeve koji se kvantitativno određuju potpuno iznad osnovne linije, a ne jednim dijelom ispod i drugim dijelom iznad bazne linije. Snimljeni ^1H NMR spektar ponekad je zahtijevao korekciju faze, zbog čega je izvršena ručna korekcija, prilikom čega se postigla simetričnost signala s obje strane baze signala (**Slika 5**).

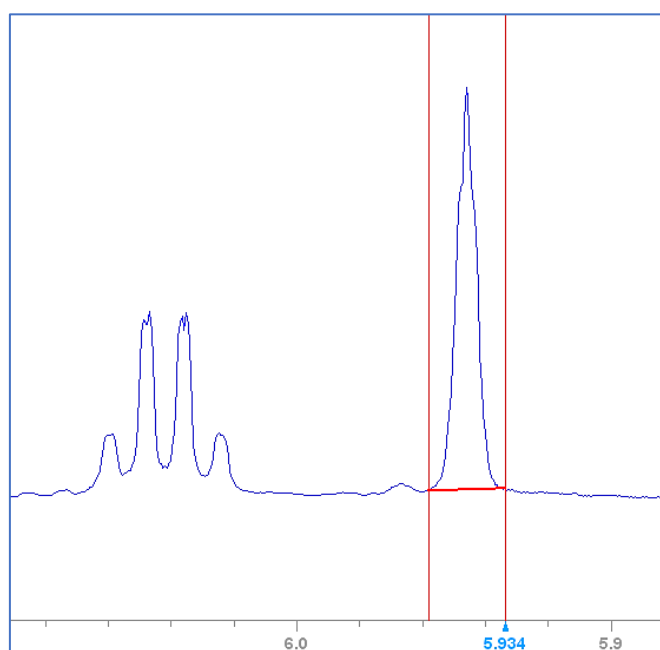


Slika 5. Prikaz korekcije faze u ^1H NMR spektru. a) Primjer signala u kojem je potrebna korekcija faze i b) prikaz istoga signala s ispravljenom fazom.

Širenje spektralnih linija opcija je kojom se poseže ako je omjer signala i šuma malen, no svi snimljeni ^1H NMR spektri pokazali su prihvatljiv navedeni omjer, zbog čega se u obradi spektara nije primjenjivalo.

Budući da su u ^1H NMR spektrima ekstrakata lista masline, kao i u ^1H NMR spektrima standardnih otopina, postojale manje varijacije u kemijskom pomaku signala aldehidnog protona internog standarda, navedeni je pik u svakom ^1H NMR spektru kalibriran na kemijski pomak od 9,83 ppm, koji odgovara kemijskom pomaku istoga pika u ^1H NMR spektru standardne otopine internog standarda.

Za ispravnu integraciju važno je definirati odgovarajuća područja integracije. Ta područja trebaju biti dovoljno široka da obuhvate cijeli signal, ali dovoljno uska da se izbjegne preklapanje s drugim signalima. Iako postoji više smjernica za pravilnu integraciju, uobičajeno je pravilo da područje integracije treba biti široko dvadeset puta širina signala (162). Kod snimanja ^1H NMR spektara prirodnih smjesa često je zbog male udaljenosti u položaju signala različitih bioloških spojeva onemogućeno slijediti navedeno pravilo, te je zadovoljavajuće definirati manje područje integracije (163). Signali su integrirani na način da je uzeto područje integracije dovoljno široko za pouzdanu integraciju, a da se pritom ne preklapa s drugim signalima. Za ispravno integriranje također je vrlo važna ravna bazna linija. Kako bi se postigle točnije vrijednosti integrala prilikom integracije bazna linija ručno je korigirana za pojedini signal (**Slika 6**).



Slika 6. Prikaz integracije singleta oleuropeina na 5,95 ppm.

4.1.2. Analiza 2D HMBC NMR spektra ekstrakta lista masline

S obzirom da se u ekstraktu lista masline očekuje veći broj spojeva, bilo je očekivano da će u ^1H NMR spektrima ekstrakata, zbog potencijalnih određenih varijacija u kemijskom pomaku signala ili moguće prisutnosti spojeva slične strukture čiji se protoni pojavljuju u sličnom području u spektru, doći do preklapanja određenih pikova. Kako bi se provela pouzdana kvalitativna analiza ekstrakta lista masline, uz ^1H NMR spektroskopiju, proveden je i HMBC 2D eksperiment.

U pojedinim 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrima izvršena je korekcija bazne linije kako bi korelacije bile pravilnijeg oblika, a signali manjeg intenziteta uočljiviji te lažni signali uklonjeni (164). Ispravljanje bazne linije izvršeno je automatski.

Nadalje, u pojedinim spektrima provedena je apodizacija spektara kako bi se povećala rezolucija te osjetljivost – omjer signala i šuma (*signal-to-noise ratio*) (165). Potom je izvršena automatska 2D Fourierova transformacija.

S obzirom na postojanost određenih manjih varijacija u kemijskom pomaku, u svim 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektrima izvršena je kalibracija $\text{CH}_3 \rightarrow \text{C}=\text{O}$ korelacije acetona- d_6 na vrijednost od 2,06 ppm (F2) i 206,11 ppm (F1), kemijske pomake koje acetona- d_6 kao NMR otapalo redom ima u ^1H NMR spektru otopine standarda siringaldehida i ^{13}C NMR spektru otopine standarda oleuropeina.

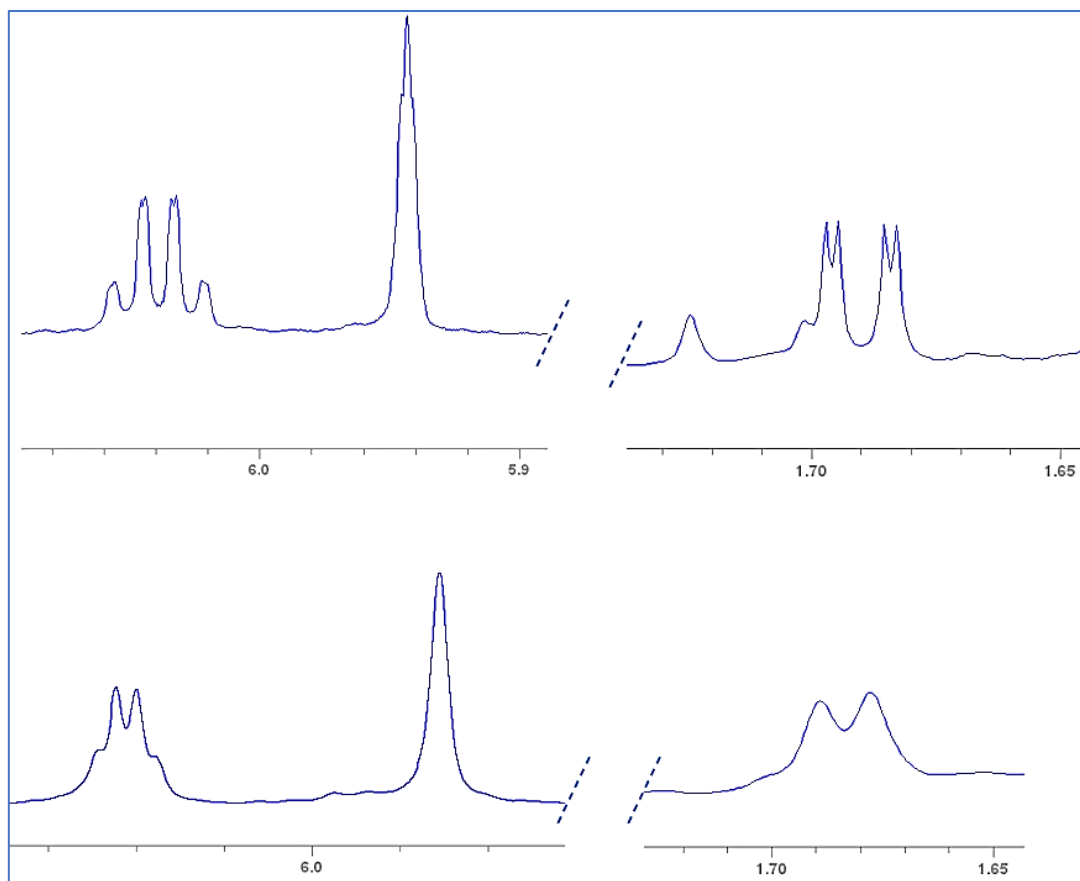
Valja napomenuti kako integracija signala nije provedena u 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrima budući da intenziteti signala nisu direktno povezani s brojem protona, već ponajprije ovise o konstanti sprege te učinkovitosti prijenosa magnetizacije, zbog čega integrali korelacija nisu primjenjivi u kvantitativnoj analizi (166).

4.2. Usporedba NMR otapala – acetona- d_6 i metanola- d_4

Kako bi se provela kvalitetna NMR analiza, poželjno je da NMR otapalo ima što bolja svojstva, kao što su dobra topljivost uzorka u otapalu, mala viskoznost i inertnost otapala (167). U ekstraktu lista masline prisutni su fenolni spojevi, za koje je očekivano da se, zbog svog izraženog polarnog karaktera, bolje otapaju u polarnim otapalima (168). Budući da se u ekstraktu lista masline mogu očekivati spojevi čije funkcionalne skupine imaju sposobnost izmjene protona s otapalom, vidljivost određenih signala te njihovo određivanje može ovisiti o odabiru NMR otapala (169). Također, smanjenjem viskoznosti NMR otapala povećava se rezolucija pikova u spektru (167). U ovom istraživanju, uspoređena su polarna otapala acetona-

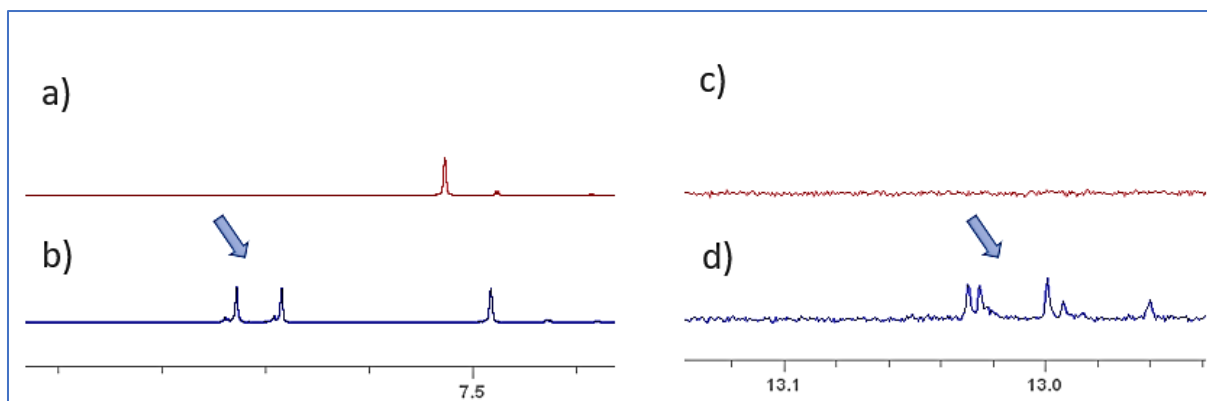
d6 i metanol-d4 u svrhu odabira prikladnijeg za kvantitativnu i kvalitativnu ^1H NMR analizu sadržaja ekstrakta lista masline.

U ^1H NMR spektru standardne otopine oleuropeina snimanog u acetonu-d6 utvrđena je veća rezolucija pikova nego li u spektru standardne otopine oleuropeina gdje je otapalo bio metanol-d4. Značajno proširenje pikova moglo se uočiti i u ^1H NMR spektrima ekstrakata lista masline kada je kao otapalo korišten metanol-d4. Cijepanje signala, koje je karakteristika većeg broja pikova oleuropeina, nije se moglo uočiti u spektru ekstrakta lista masline snimljenog u metanolu-d4 kod pikova koji imaju relativno malu konstantu sprege ($J \leq 1,5$ Hz), među kojima je i signal oleuropeina pri 1,68 ppm koji potječe od H-10, za koji je utvrđeno da se pojavio u obliku većeg dubleta ($J = 7,0$ Hz) umjesto karakterističnih dvaju manjih dubleta ($J = 7,1$ Hz, $J = 1,5$ Hz) (**Slika 7**). Budući da se u spektrima uzoraka snimanih u metanolu-d4 mogla uočiti slabija rezolucija svih pikova, a ne samo pojedinih, vrlo je vjerojatno da je proširenje signala posljedica veće viskoznosti metanola-d4, koja iznosi 0,54 mPa·s pri 298 K te je gotovo dvaput veća od viskoznosti acetona-d6 u iznosu od 0,31 mPa·s pri 298 K (116), ako se pritom zanemari mogući utjecaj deuteriranog protona na vrijednost navedenog fizikalnog svojstva. Iako je utjecaj viskoznosti NMR otapala na širinu pikova poznat u literaturi, prema svim saznanjima, isti nije ispitan na rezoluciju signala fenolnih spojeva u analizi ^1H NMR spektara ekstrakta lista masline, niti je na tom svojstvu temeljen odabir NMR otapala za kvalitativnu i/ili kvantitativnu analizu navedenih spojeva.



Slika 7. Usporedba ^1H NMR spektara ekstrakata lista masline u acetonu- d_6 (gore) i metanolu- d_4 (dolje). Vidljiva je bolja rezolucija signala koji potječu od H-8 (1), H-1 (2) i H-10 (3) oleuropeina identificiranog u ekstraktima u acetonu- d_6 .

Nadalje, u ^1H NMR spektrima otopina standarda oleuropeina koncentracije $2,0 \text{ mmol/dm}^3$ i ekstrakata lista masline detektirani su signali oleuropeina, bez obzira na korišteno otapalo (aceton- d_6 ili metanol- d_4). *Popis kemijskih pomaka pikova oleuropeina u pojedinom otapalu, te usporedba istih u ovisnosti o otapalu navedena je u 4.3.1.1.* Međutim, dva singleta oleuropeina koji se odnose na C-5' OH i C-6' OH mogli su se uočiti samo u spektru standarda oleuropeina snimanog u acetonu- d_6 , redom na 7,74 i 7,69 ppm. Također, singleti flavonoida na $\sim 13,0 \text{ ppm}$, koji se odnose na C-5 OH, bili su uočeni samo u spektrima ekstrakata otopljenih u acetonu- d_6 (**Slika 8**).

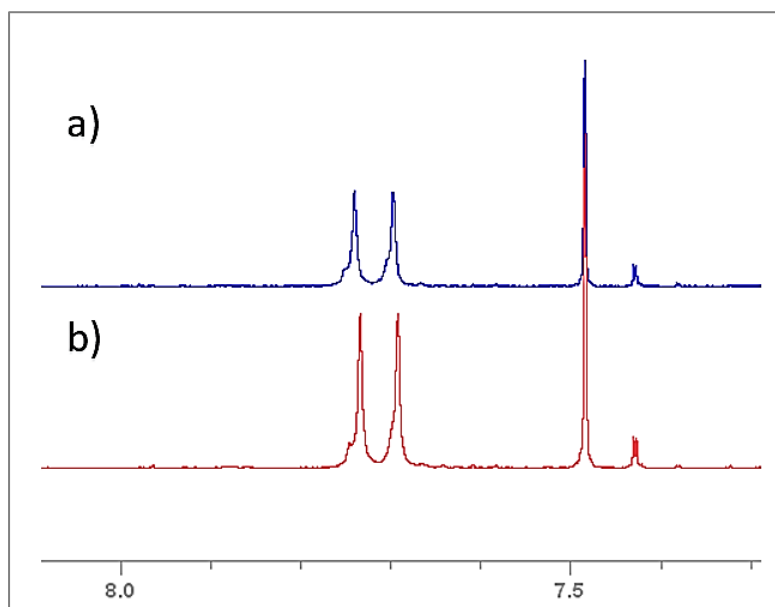


Slika 8. ^1H NMR spektar a) otopine standarda oleuropeina u metanolu- d_4 i b) acetonu- d_6 , c) ekstrakta lista masline u metanolu- d_4 i d) acetonu- d_6 . Može se primijetiti prisutnost signala protona hidroksilnih skupina (označenih strelicom) na 7,74 i 7,69 ppm koji pripadaju oleuropeinu (b) i $\sim 13,0$ ppm koji pripadaju flavonoidima u acetonu- d_6 (d), te odsutnost istih u metanolu- d_4 (a, c).

Odsutnost navedenih signala u spektrima uzoraka snimanih u metanolu- d_4 može se objasniti svojstvom metanola, kao protičnog otapala, da sudjeluje u brzim protonskim izmjenama sa spojevima prisutnima u uzorku koji su podložni izmjeni (149). Labilni protoni, koji su najčešće vezani na heteroatome, mogu se zamijeniti s deuteriranim protonom otapala (170). Deuterij ne daje signal u spektru, zbog čega je u ^1H NMR spektru u metanolu- d_4 evidentna odsutnost pikova oleuropeina i flavonoida koji pripadaju labilnim protonima vezanih za kisikov atom. Međutim, Kontogianni i sur.(171) utvrđuju odsutnost C-5' OH i C-6' OH singleta u ^1H NMR spektru standardne otopine oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije 5 mmol/dm^3 pri 292 K, a iste uočavaju redom na 7,75 i 7,73 ppm tek dodatkom pikrinske kiseline, koncentracije 8 mmol/dm^3 u acetonu- d_6 . Pritom navode da se tek zajedničkom uporabom bezvodnog aprotičnog otapala, pikrinske kiseline i niske temperature navedeni singleti pojavljuju u ^1H NMR spektru, te da su isti visoke razlučivosti. Charisiadis i sur.(149) spominju kako pikrinska kiselina smanjuje izmjenu protona između OH skupina fenola i rezidualne vode prisutne u otopini, što dovodi do pojave pikova koji potječu od labilnih protona, a to ujedno i bilježe u svom istraživanju u ^1H NMR spektru metanolnog ekstrakta lista masline u DMSO- d_6 pri 292 K, na spektralnoj širini 8,5 – 9 ppm i $\sim 13,0$ ppm. Međutim, u istraživanju navode kako je već samo uporabom polarnih aprotičnih otapala koji imaju mogućnost stvaranja vodikovih veza sa spojevima u otopini, kao što su aceton- d_6 ili DMSO- d_6 , smanjena mogućnost izmjene protona između promatranog spoja i rezidualne vode ili drugih komponenti prisutnih u otopini, kao što su ekstrahirane kiseline pri sobnoj temperaturi, što dovodi do vidljivih OH signala u ^1H NMR spektru. Navedeno dokazuju samo u ^1H NMR

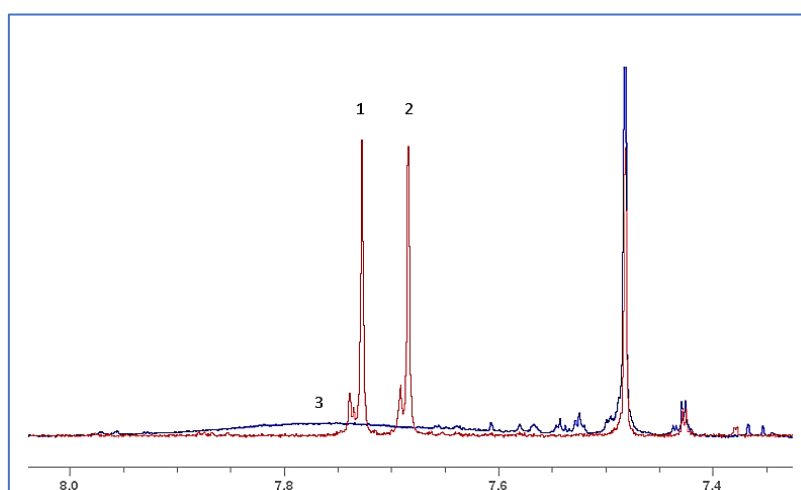
spektru otopine standarda naringenina, ali ne i u spektru ekstrakta lista masline. Također, otapanjem različite količine suhog ekstrakta lista masline u NMR otapalu indirektno dokazuju da koncentracija fenolnih spojeva u vodenom i metanolnom ekstraktu lista masline utječe na pojavu i razlučivost OH singleta u ^1H NMR spektru, prilikom čega su pikovi u području 8,5 – 8,9 ppm bili bolje razlučivi u manje koncentriranoj otopini, dok u onima najviše koncentriranima nisu bili ni vidljivi (ispitan raspon koncentracije 0,05 – 80 mg ekstrakta u 600 μL DMSO- d_6 , $T = 292\text{ K}$). Navedenu pojavu pripisuju većoj zastupljenosti izmjene protona između fenola i ekstrahiranih kiselina u koncentriranijim otopinama.

Budući da je utvrđeno kako količina otopljenog ekstrakta lista masline utječe na prisutnost singleta labilnih protona, postojala je mogućnost da ^1H NMR spektar otopine standarda oleuropeina koncentracije 2,0 mmol/dm^3 sadrži C-5' OH i C-6' OH signale zbog korištene manje koncentracije u odnosu na Kontogianni i sur. (170), čija je koncentracija oleuropeina 5 mmol/dm^3 . Stoga je istražena prisutnost signala u ^1H NMR spektru na još dvije otopine standarda oleuropeina, niže ($c = 3,7\text{ mmol/dm}^3$) i više ($c = 6,6\text{ mmol/dm}^3$) koncentracije od 5 mmol/dm^3 , u acetonu- d_6 . Oba ^1H NMR spektra sadržavala su C-5' OH i C-6' OH signale oleuropeina (**Slika 9**). Nepodudarnost s literaturom nije razjašnjena, no može se utvrditi kako koncentracija nije imala utjecaja na navedeno, te pretpostaviti kako su tomu mogući uzrok postavke snimanja ^1H NMR spektara.



Slika 9. Odsječak ^1H NMR spektra otopine standarda oleuropeina koncentracije a) 3,7 mmol/dm^3 i b) 6,6 mmol/dm^3 u području 7 – 8 ppm.

Nadalje, navedeni se pikovi oleuropeina (C-5' OH i C-6' OH singleti) ne pojavljuju u spektrima ekstrakata lista masline snimljenih u acetonu-d₆. Na kemijskom pomaku na kojem se inače nalaze navedeni signali uočen je tek iznimno širok signal, koji bi odgovarao navedenim protonima (**Slika 10**). Postoji mogućnost da je izostanak signala uzrokovan izmjenom protona između oleuropeina i drugih spojeva koji su prisutni u smjesi ekstrakta lista masline, kao što je već prethodno navedeno prema Charisiadis i sur.(149), no potrebno je još potvrditi točan razlog njihove odsutnosti u navedenim spektrima.



Slika 10. ¹H NMR spektar otopine standarda oleuropeina (crveno) i ekstrakta lista masline (plavo) u acetonu-d₆. Pikovi oleuropeina na 7,74 i 7,69 ppm koji se odnose na C-5' OH (1) i C-6' OH (2) u spektru standarda te širok signal na ~ 7,7 ppm (3).

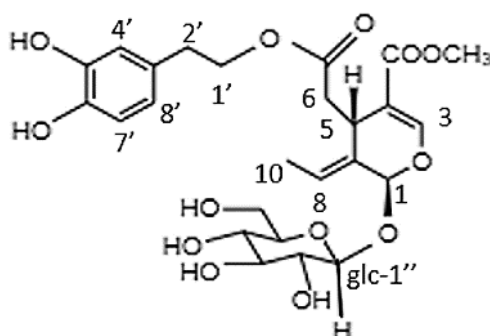
Kao povoljnije NMR otapalo pokazao se aceton-d₆ u odnosu na metanol-d₄, zbog veće rezolucije cijeloga ¹H NMR spektra te pojavnosti pikova OH skupina fenola, stoga je aceton-d₆ odabran za uporabu u kvalitativnoj i kvantitativnoj NMR analizi. Velik dio istraživanja koja su se bavila identificiranjem fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline ¹H NMR spektroskopijom, te u svim istraživanjima koja su se bavila kvantifikacijom oleuropeina primjenom ¹H NMR spektroskopije DMSO-d₆ je korišten kao NMR otapalo. Unatoč tomu, u ovom istraživanju upotrijebljen je aceton-d₆ zbog manje viskoznosti acetona u odnosu DMSO, za što se pretpostavlja da bi osiguralo veću rezoluciju ¹H NMR spektra te posljedično točniju interpretaciju i kvantifikaciju spojeva (116, 167).

4.3. Sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline

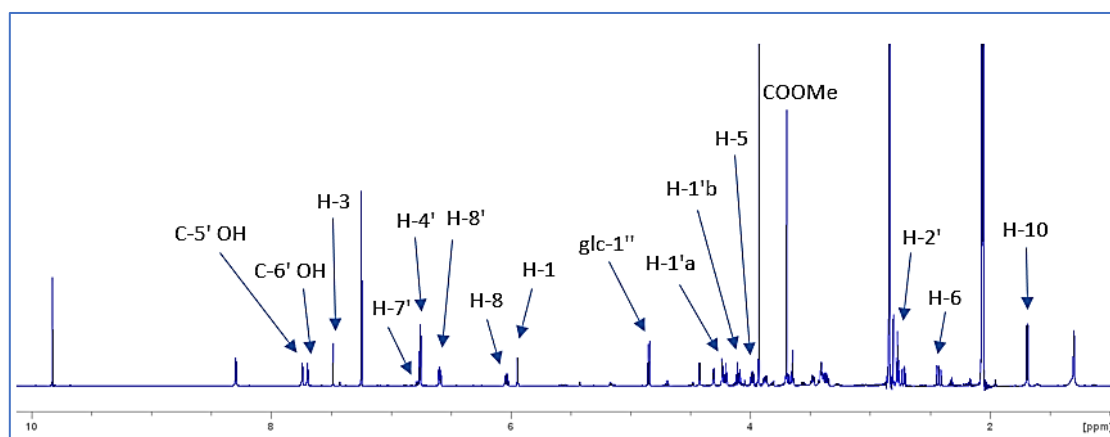
4.3.1. Identifikacija oleuropeina u ekstraktu lista masline

4.3.1.1. ^1H NMR spektar ekstrakta lista masline

Ekstrakt lista masline sastoji se od više različitih fenolnih spojeva čiji signali u ^1H NMR spektru ostvaruju slične kemijske pomake, što može otežati identifikaciju samih spojeva, a time i pouzdanu interpretaciju sastava ekstrakta. Uz to, budući da NMR otapalo ima utjecaja na kemijski pomak pojedinog signala, podaci iz literature o kemijskom pomaku pikova se razlikuju ovisno o korištenom otapalu. Kako bi se izbjegao taj problem i sa sigurnošću ustvrdila prisutnost oleuropeina u ekstraktima lista masline, snimljeni su ^1H NMR spektri otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 . U spektru su se mogli uočiti signali karakteristični za oleuropein (**Slika 11**), uključujući i singlet na 5,95 ppm (**Slika 12**). Usporedbom sa ^1H NMR spektrom standarda, svi ^1H NMR spektri ekstrakata lista maslina u acetonu- d_6 pokazali su prisustvo oleuropeina.



Slika 11. Kemijska struktura oleuropeina s označenim H atomima.



Slika 12. ^1H NMR spektar otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 .

Zbog već prethodno navedene usporedbe otapala, određeni broj ekstrakata sniman je u metanolu-d4, pa je ujedno i snimljen standard oleuropeina u metanolu-d4. U navedenim ekstraktima snimanih u metanolu-d4, također je identificiran oleuropein ¹H NMR spektroskopijom. Većina pikova karakterističnih za oleuropein imala je veći kemijski pomak u odnosu na istovrsne pikove prisutne u spektrima uzoraka koji su bili snimani u acetonu-d6 (**Tablica 3**). Kemijski pomak pojedinog signala oleuropeina velikim je dijelom u skladu s literaturom (153 – 155, 172 – 174), a manje varijacije potječu od utjecaja otapala.

Tablica 3. Detektirani pikovi oleuropeina u ¹H NMR spektrima standardne otopine oleuropeina i ekstrakata lista masline u acetonu-d6 i metanolu-d4.

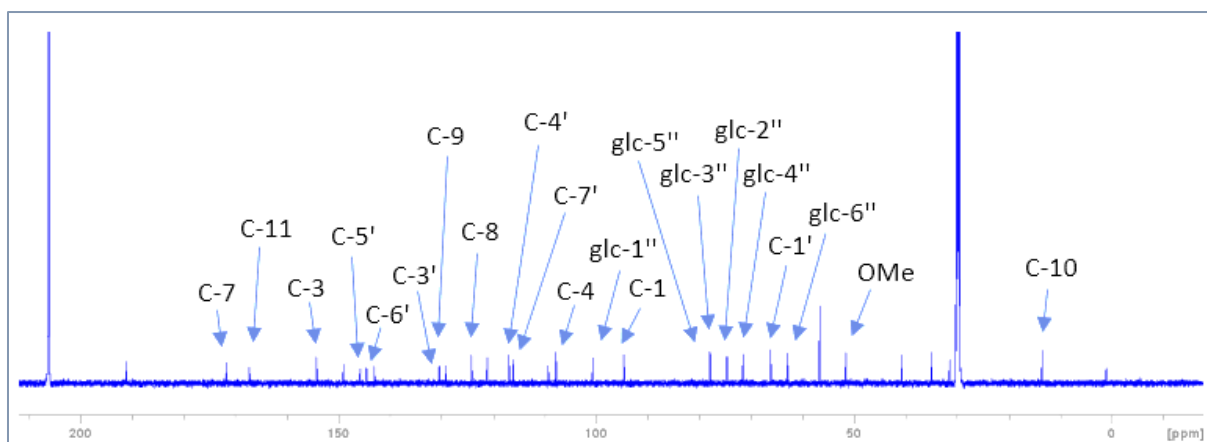
	<i>oleuropein (standardna otopina oleuropeina u acetonu-d6) (δ/ppm)</i>	<i>oleuropein (ekstrakt lista masline u acetonu-d6) (δ/ppm)</i>	<i>oleuropein (standardna otopina oleuropeina u metanolu-d4) (δ/ppm)</i>	<i>oleuropein (ekstrakt lista masline u metanolu-d4) (δ/ppm)</i>
<i>H-1</i>	5,94 s	5,95 s	5,93 s	5,93 s
<i>H-3</i>	7,49 s	7,49 s	7,53 s	7,54 s
<i>H-5</i>	3,98 dd, <i>J</i> =9,5 Hz, <i>J</i> =4,5 Hz	3,98 dd, <i>J</i> =9,5 Hz, <i>J</i> =4,5 Hz	3,99 dd, <i>J</i> =9,3 Hz, <i>J</i> =4,6 Hz	3,99 dd, <i>J</i> =9,3 Hz, <i>J</i> =4,4 Hz
<i>H-6</i>	2,42 dd, <i>J</i> =14,3 Hz, <i>J</i> =9,5 Hz	2,42 dd, <i>J</i> =14,3 Hz, <i>J</i> =9,5 Hz	2,46 dd, <i>J</i> =14,2 Hz, <i>J</i> =9,3 Hz	2,46 dd, <i>J</i> =14,2 Hz, <i>J</i> =9,3 Hz
<i>H-8</i>	6,04 q, <i>J</i> =7,2 Hz	6,04 q, <i>J</i> =7,3 Hz	6,10 q, <i>J</i> =7,2 Hz	6,10 q, <i>J</i> =7,0 Hz
<i>H-10</i>	1,69 dd, <i>J</i> =7,1 Hz, <i>J</i> =1,5 Hz	1,69 dd, <i>J</i> =7,1 Hz, <i>J</i> =1,5 Hz	1,68 dd, <i>J</i> =7,1 Hz, <i>J</i> =1,5 Hz	1,68 d, <i>J</i> =7,0 Hz
<i>H-1'a</i>	4,22 m	4,22 m	4,12 m	4,13 m

<i>H-1'b</i>	4,10 m	4,10 m	4,22 m	4,23 m
<i>H-2'</i>	2,77 t, <i>J</i> =7,1 Hz	2,77 t, <i>J</i> =7,1 Hz	2,78 t, <i>J</i> =7,1 Hz	2,79 t, <i>J</i> =7,1 Hz
<i>H-4'</i>	6,76 s	6,76 s	6,68 d, <i>J</i> =2,1 Hz	6,70 d, <i>J</i> =1,6 Hz
<i>H-7'</i>	6,79 d, <i>J</i> =8,0 Hz	6,79 d, <i>J</i> =8,0 Hz	6,70 d, <i>J</i> =8,0 Hz	6,73 d, <i>J</i> =8,0 Hz
<i>H-8'</i>	6,59 dd, <i>J</i> =8,0 Hz, <i>J</i> =2,2 Hz	6,59 dd, <i>J</i> =8,0 Hz, <i>J</i> =2,2 Hz	6,56 dd, <i>J</i> =8,0 Hz, <i>J</i> =2,1 Hz	6,58 dd, <i>J</i> =8,0 Hz, <i>J</i> =1,6 Hz
<i>COOMe</i>	3,70 s	3,70 s	3,73 s	3,74 s
<i>glc-1''</i>	4,85 d, <i>J</i> =7,8 Hz	4,85 d, <i>J</i> =7,8 Hz	4,82 d, <i>J</i> =7,8 Hz	4,84 d, <i>J</i> =7,8 Hz
<i>C-5' OH</i>	7,59 s	-	-	-
<i>C-6' OH</i>	7,55 s	-	-	-

s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvadriplet, m – multiplet, dd – dupli dublet

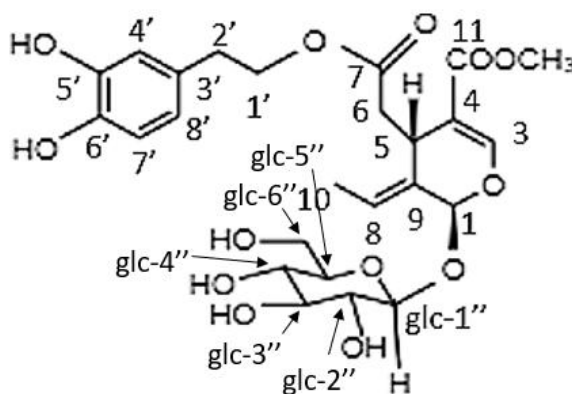
4.3.1.2. ^{13}C NMR spektar ekstrakta lista masline

S ciljem dodatne potvrde prisutnosti oleuropeina u ekstraktima lista masline, snimljeni su ^{13}C NMR spektri standardne otopine oleuropeina u acetonu- d_6 . U ^{13}C NMR spektrima snimanih standarda vidljivi su signali karakteristični za oleuropein (**Slika 13**).



Slika 13. ^{13}C NMR spektar otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 .

Zbog manjih odstupanja u kemijskom pomaku signala oleuropeina u ^{13}C NMR spektrima ekstrakta lista masline, kemijski je pomak signala acetona- d_6 (karbonilnog C atoma) u spektrima svih ekstrakata kalibriran na vrijednost koju je imao u ^{13}C NMR spektrima otopina standarda oleuropeina, na 206,11 ppm. Usporedivši ^{13}C NMR spektre ekstrakata i standarda, sličnost u kemijskim pomacima signala u potpunosti je ukazivala na prisutnost oleuropeina, čime je, uz ^1H NMR spektroskopiju, navedeni spoj dodatno identificiran u ekstraktima lista masline (**Slika 14**).



Slika 14. Kemijska struktura oleuropeina s označenim C atomima.

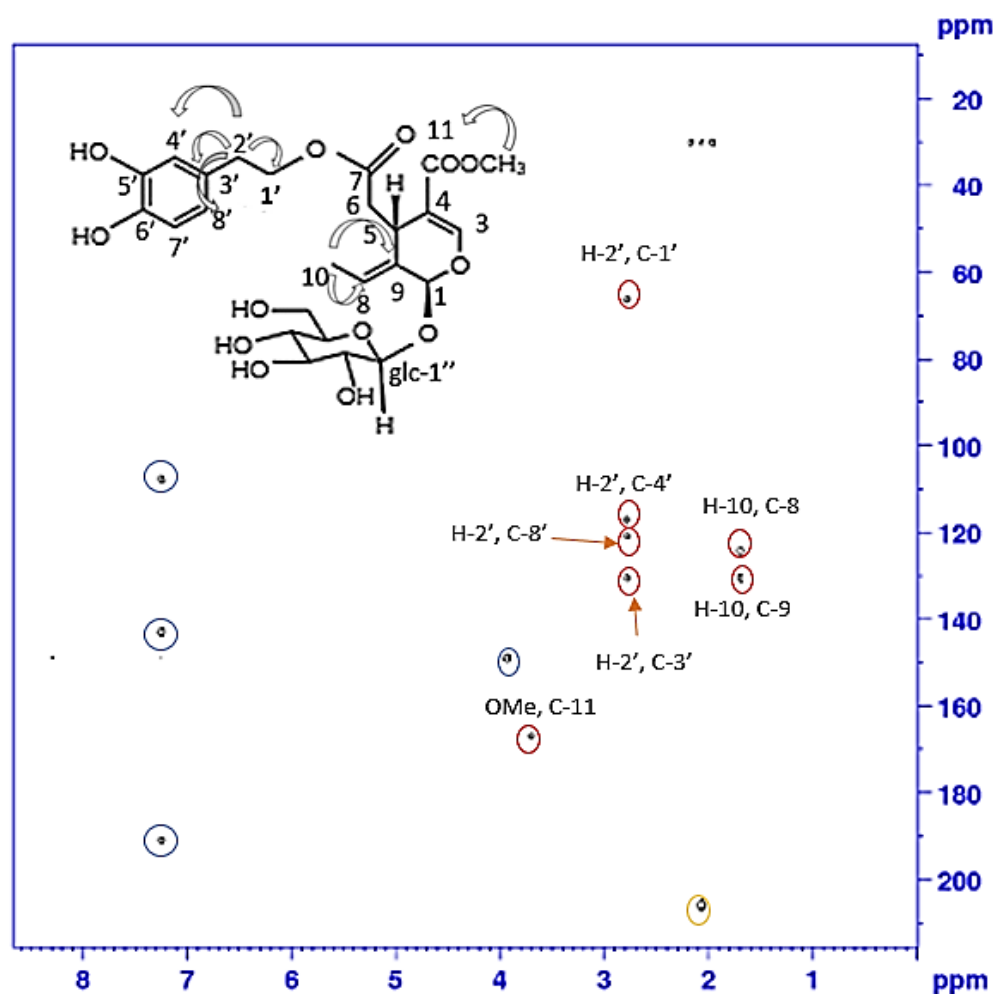
Provedena je i ^{13}C NMR analiza spektara ekstrakta lista masline u metanolu- d_4 . Oleuropein je, unatoč tomu što standard istoga nije sniman ^{13}C NMR spektroskopijom u metanolu- d_4 , identificiran i u ^{13}C NMR spektrima ekstrakata lista masline snimanih u metanolu- d_4 oslanjajući se na podatke iz literature, koji su pokazali dobro poklapanje u kemijskom pomaku pikova (153 – 155, 172). Većina signala oleuropeina u spektrima ekstrakata otopljenih u acetonu- d_6 većeg je kemijskog pomaka u odnosu na pikove u spektrima ekstrakata snimanih u metanolu- d_4 , što je obrnut slučaj nego u ^1H NMR spektrima (**Tablica 3**).

Tablica 3. Detektirani pikovi oleuropeina u ^{13}C NMR spektrima standardne otopine oleuropeina i ekstrakata lista masline u acetonu-d6 i metanolu-d4.

	<i>oleuropein (standardna otopina oleuropeina u acetonu-d6) (δ /ppm)</i>	<i>oleuropein (ekstrakt lista masline u acetonu-d6) (δ /ppm)</i>	<i>oleuropein (ekstrakt lista masline u metanolu-d4) (δ /ppm)</i>
C-1	94,60	94,65	93,87
C-3	154,21	154,29	153,81
C-4	107,80	107,84	107,97
C-6	40,74	40,79	39,96
C-7	171,65	171,77	171,87
C-8	124,15	124,19	123,55
C-9	130,42	130,38	129,05
C-10	13,54	13,57	12,23
C-11	167,20	167,28	167,33
OMe	51,51	51,57	50,63
C-1'	66,13	66,19	65,54
C-3'	130,49	130,41	129,38
C-4'	116,86	116,86	115,73
C-5'	145,81	145,86	144,82
C-6'	144,55	144,60	143,50
C-7'	116,11	116,12	115,12
C-8'	121,13	121,07	119,97
glc-1''	100,67	100,64	99,52
glc-2''	74,64	74,60	73,34
glc-3''	77,87	77,84	76,49
glc-4''	71,51	71,48	69,91
glc-5''	78,03	77,99	76,96
glc-6''	62,95	62,89	61,31

4.3.1.3. 2D HMBC NMR spektar ekstrakta lista masline

U 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrima ekstrakata lista masline bili su očekivani signali koji pripadaju različitim spojevima. Zbog lakše identifikacije oleuropeina u navedenim spektrima, prvotno su snimljeni 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektri otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 , koncentracije 1,45 i 3,68 mmol/dm³. U oba spektra vidljive su četiri korelacije koje pripadaju siringaldehidu ($\text{H}-2,6 \rightarrow \text{C}-2,4, \text{C}-2,6, \text{C}-7$; $\text{OMe} \rightarrow \text{C}-3,5$) (175, 176). U oba spektra mogu se uočiti korelacije koje odgovaraju strukturi oleuropeina. Većina njih, s obzirom da je 2D ^1H - ^{13}C HMBC analiza oleuropeina iznimno rijetko provedena u literaturi te je ograničena na jedno istraživanje (149), još nije zabilježena u literaturi. Tako oba HMBC spektra otopine standarda oleuropeina pokazuju 2J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelaciju između H-10 i C-8 te 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelaciju istoga protona s C-9 ($\text{H}-10 \rightarrow \text{C}-8, \text{C}-9$). Također, protoni metilnog dijela esterske skupine bilježe 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelaciju s karbonilnim ugljikom (C-11) esterske skupine ($\text{OMe} \rightarrow \text{C}-11$). Zabilježene su i 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) i 2J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacije alifatskih protona na položaju 2' s ugljicima benzenskog prstena i C-1' ($\text{H}-2' \rightarrow \text{C}-1', \text{C}-3', \text{C}-4', \text{C}-8'$) (**Slika 15**).

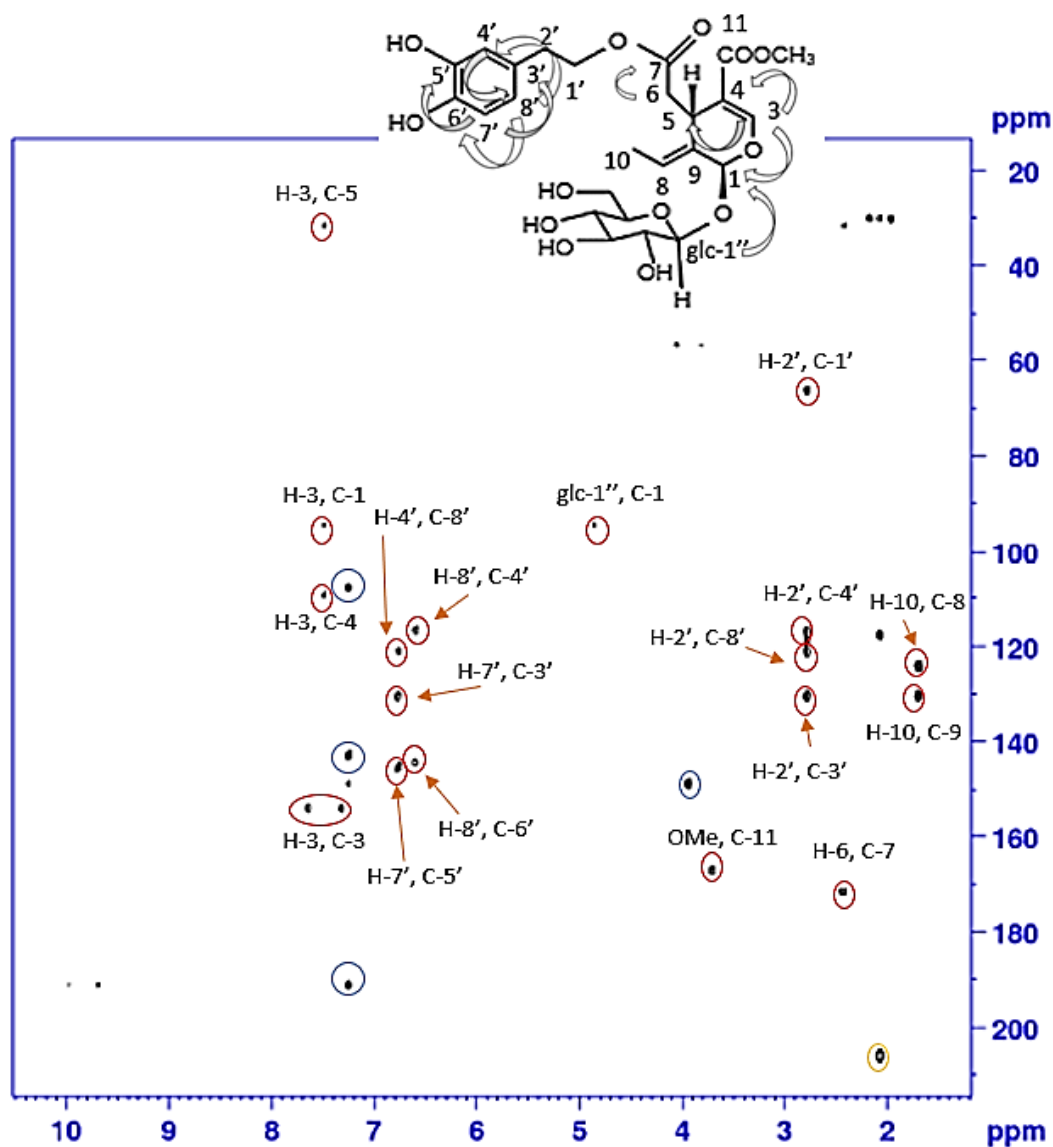


Slika 15. 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $1,45 \text{ mmol/dm}^3$.

Detektirane su korelacije oleuropeina (crveno), siringaldehida (plavo) i otapala (žuto). Uočene nJ (^1H , ^{13}C) korelacije oleuropeina prikazane su na strukturi molekule.

Međutim, u spektru otopine standarda oleuropeina koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$ primijećen je veći broj signala, pa se tako uz navedene korelacije (koje su bile vidljive i u spektru otopine standarda oleuropeina koncentracije $1,45 \text{ mmol/dm}^3$), mogu uočiti i 3J (^1H , ^{13}C) korelacije između protona i ugljika benzenskog prstena, koje potvrđuju odsustvo heteroatoma u navedenom prstenu ($\text{H-4}' \rightarrow \text{C-8}'$; $\text{H-7}' \rightarrow \text{C-3}'$, $\text{C-5}'$; $\text{H-8}' \rightarrow \text{C-4}'$, $\text{C-6}'$). Nadalje, utvrđena je korelacija između protona na položaju C-6 i karbonilnog ugljika udaljenim za dvije kemijske veze ($\text{H-6} \rightarrow \text{C-7}$). Detektirane su i korelacije H-3 s ugljicima heterocikličkog prstena sekoiridoidnog skeleta ($\text{H-3} \rightarrow \text{C-1}$, C-4 , C-5). Uočena je i rezidualna 1J (^1H , ^{13}C) korelacija između navedenog protona i ugljika s kojim ostvaruje kemijsku vezu ($\text{H-3} \rightarrow \text{C-3}$). Konačno, uočeno je da anomerni proton glukoze pokazuje 3J (^1H , ^{13}C) korelaciju s C-1 na

heterocikličkom prstenu, čime je potvrđena O-glukozidna veza u strukturi spoja (glc-1'' → C-1) (**Slika 16**). S obzirom da ^1H - ^{13}C HMBC spektar otopine standarda oleuropeina koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$ sadrži više signala, može se zaključiti kako prisutnost određenih korelacija oleuropeina, pri rabljenim akvizicijskim parametrima, ovisi o koncentraciji navedenog spoja. Također, evidentno je da navedeni HMBC spektar sadrži više podataka ključnih za identifikaciju oleuropeina, što ga je činilo relevantnijim za tu svrhu.



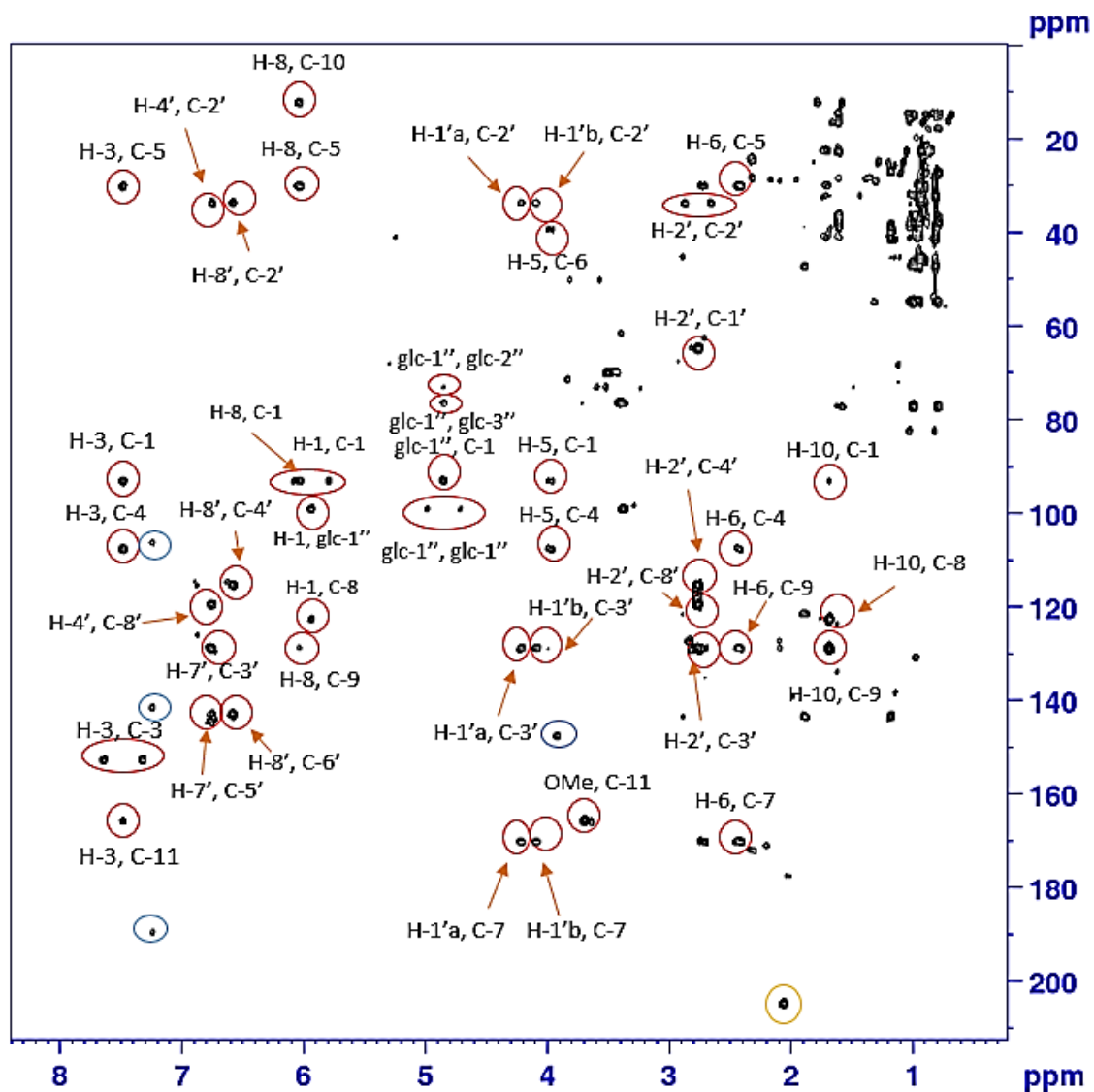
Slika 16. 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$.

Detektirane su korelacije oleuropeina (crveno), sirinaldehida (plavo) i otapala (žuto). Uočene nJ (^1H , ^{13}C) korelacije oleuropeina koje nisu prisutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektru standarda oleuropeina koncentracije $1,45 \text{ mmol/dm}^3$ prikazane su na strukturi molekule.

Snimljeni 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektri ekstrakata lista masline otopljenih u acetonu- d_6 sadrže korelacije koje su prethodno utvrđene u spektrima otopine standarda oleuropeina, čime je ovaj spoj, uz ^1H i ^{13}C NMR spektroskopiju, identificiran u ekstraktu lista masline i metodom 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektroskopije. Međutim, u spektrima ekstrakata uočen je veći broj korelacija za koje je pokazano da pripadaju oleuropeinu. Većina tih signala, prema svim saznanjima, također nije zabilježena u literaturi za molekulu oleuropeina (149). Jedna od važnijih korelacija vidljiva u HMBC spektrima ekstrakata jest između protona na položaju 1' i karbonilnog ugljika (C-7) udaljenim za tri kemijske veze ($\text{H-1'a} \rightarrow \text{C-7}$; $\text{H-1'b} \rightarrow \text{C-7}$), koja potvrđuje estersku vezu kojom je sekoiridoidni skelet vezan na fenolni dio strukture. Vidljive su i druge 2J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$), odnosno 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacije protona na položaju 1' ($\text{H-1'a} \rightarrow \text{C-2'}$, C-3' ; $\text{H-1'b} \rightarrow \text{C-2'}$, C-3') Nadalje, uočene su 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacije H-1 protona sekoiridoidnog skeleta s ugljikom na položaju 8 i s anomernim ugljikom glukoze ($\text{H-1} \rightarrow \text{C-8}$, glc-1''), što dodatno potvrđuje postojanje kemijske veze između aglikonskog dijela spoja i glukoze. Navedeni spektri pokazali su prisutnost i dviju korelacija između anomernog protona glukoze i pojedinih ugljika glukoze, udaljenih za dvije, odnosno tri kemijske veze ($\text{glc-1''} \rightarrow \text{glc-2''}$, glc-3''). Uočene su i 2J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$), odnosno 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacije H-5 te H-8 protona s odgovarajućim ugljicima sekoiridoidnog skeleta ($\text{H-5} \rightarrow \text{C-1}$, C-4 , C-6 ; $\text{H-8} \rightarrow \text{C-1}$, C-5 , C-9 , C-10). U odnosu na HMBC spektar otopine standarda oleuropeina, primijećen je i veći broj 2J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$), odnosno 3J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacija koji se odnose na H-3, H-6, H-10, H-4' i H-8' protone, koje također odgovaraju strukturi oleuropeina ($\text{H-3} \rightarrow \text{C-11}$; $\text{H-6} \rightarrow \text{C-4}$, C-5 , C-9 ; $\text{H-4'} \rightarrow \text{C-2'}$; $\text{H-8'} \rightarrow \text{C-2'}$). Uočena je i jedna 4J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacija ($\text{H-10} \rightarrow \text{C-1}$), a prisutnost su pokazale i određene 1J ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) korelacije ($\text{H-1} \rightarrow \text{C-1}$; $\text{H-2'} \rightarrow \text{C-2'}$; $\text{glc-1''} \rightarrow \text{glc-1''}$) (**Slika 17**). Međutim, sve navedene korelacije nisu bile prisutne u svakom spektru ekstrakta. U pojedinim ekstraktima bili su odsutni signali $\text{H-10} \rightarrow \text{C-1}$, $\text{H-3} \rightarrow \text{C-11}$ i $\text{glc-1''} \rightarrow \text{glc-2''}$, glc-3'' . Samo u jednom ekstraktu, čiji ^1H NMR spektar ima pikove oleuropeina slabog intenziteta, nije utvrđena ni jedna korelacija koja potječe od oleuropeina. Može se pretpostaviti kako je prisutnost navedenih korelacija ovisila o koncentraciji oleuropeina u uzorku s obzirom da su akvizicijski parametri uvijek bili jednaki. Prema tome, budući da velik dio korelacija koje su zabilježene u HMBC spektrima ekstrakata nije ni bio prisutan u HMBC spektru otopine standarda oleuropeina, može se indirektno zaključiti da su gotovo svi ekstrakti sadržavali veću koncentraciju oleuropeina od uzoraka standarda. Nadalje, u području 6 - 10 ppm (F2) bilo je vrlo malo drugih korelacija koje ne pripadaju oleuropeinu. Primijećene su dvije korelacije na 6,89 ppm (F2) za koje je, usporedbom s ^1H NMR spektrom standarda sekoiridoida i flavonoida uključenih u ovo istraživanje, te uključujući u obzir i cjelokupni ^1H

NMR spektar ekstrakta lista masline, utvrđeno da ne pripadaju nijednom od navedenih spojeva. Također, u području 12 - 13 ppm (F2), karakteristično samo za flavonoide, nije bilo prisutnih korelacija. Stoga, korelacije koje potječu od istraženih flavonoida ili drugih sekoiridoida nisu detektirane u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektrima ekstrakata. Među svim navedenim korelacijama oleuropeina, Charisiadis i sur.(149) navode samo $\text{H-8} \rightarrow \text{C-1}$; $\text{H-1} \rightarrow \text{glc-1''}$; $\text{H-3} \rightarrow \text{C-1, C-5, C-11}$; $\text{H-6} \rightarrow \text{C-5, C-7}$; $\text{H-1'} \rightarrow \text{C-7, C-2'}$; $\text{H-4'} \rightarrow \text{C-2'}$. Međutim, bilježe i korelacije $\text{H-5} \rightarrow \text{C-7, C-11}$; $\text{H-4'} \rightarrow \text{C-5'}$, kao i korelacije protona hidroksilnih skupina (C-5' OH i C-6' OH) s odgovarajućim ugljikima, koje u ovom istraživanju nisu utvrđene. Prisutnost korelacija u kojima sudjeluju labilni protoni omogućena je u navedenom istraživanju dodatkom već spomenute pikrinske kiseline, koja u ograničenom rasponu koncentracije smanjuje izmjenu labilnih protona, što rezultira pojavom signala u spektru. U 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru standarda oleuropeina nisu bili prisutni C-5' OH i C-6' OH signali, što upućuje na to, s obzirom da nisu bile prisutne ni druge korelacije pojedinih protona, kako je sama koncentracija oleuropeina mogla utjecati na odsutnost navedene korelacije. Međutim, u ekstraktu lista masline izgledno je, zbog prisutnosti velikog broja korelacija, da je oleuropein u većoj koncentraciji, no unatoč tomu, C-5' OH i C-6' OH signali, kao ni u ^1H NMR spektru ekstrakta, nisu bili prisutni. Stoga je razlog zašto su navedene korelacije C-5' OH i C-6' OH protona oleuropeina bile odsutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektrima ekstrakata, ali i otopine standarda oleuropeina, sudjelovanje oleuropeina u izmjeni protona s drugim spojevima prisutnima u ekstraktu.

U dostupnim podacima iz literature, osim navedenoga, nema bilješki da je provedena 2D ^1H - ^{13}C HMBC analiza oleuropeina, stoga je ovo među prvim sveobuhvatnim HMBC analizama navedenoga spoja u matriksu kao što je fenolni ekstrakt lista masline.



Slika 17. 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 . Detektirane su korelacije oleuropeina (crveno), siringaldehida (plavo) i otapala (žuto).

4.3.2. Određivanje sadržaja oleuropeina u ekstraktu lista masline

4.3.2.1. Baždarni pravci za kvantifikaciju oleuropeina

U svim snimljenim spektrima pripremljenih otopina standarda utvrđena je prisutnost signala internog standarda i oleuropeina, osim jedne iznimke u kojoj je razrjeđeni oleuropein bio najmanje koncentracije ($0,02 \text{ mmol/dm}^3$), gdje je karakteristični singlet za oleuropein bio odsutan.

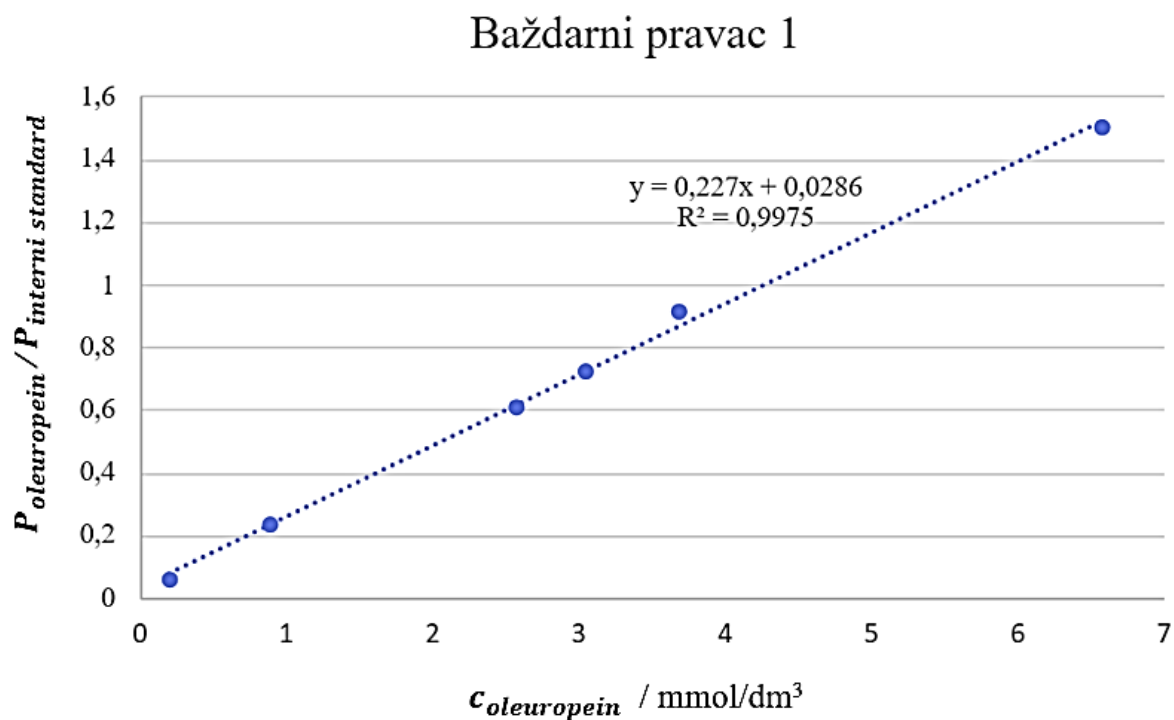
Kako bi se dobili baždarni pravci, bilo je potrebno provesti integraciju signala karakterističnih za oleuropein, odnosno interni standard. Snimljeni ^1H NMR spektri uzoraka pokazali su vrlo dobro integrabilan signal za oleuropein na položaju oko 5,95 ppm, za koji se i literaturno navodi kao karakterističnog za oleuropein (177). Napravljena je integracija navedenog signala i integracija signala internog standarda, te je izračunan omjer površine signala za oleuropein ($P_{oleuropein}$) i signala internog standarda ($P_{interni\ standard}$). Izrađen je baždarni pravac na kojem je prikazana ovisnost omjera $P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$ o koncentraciji oleuropeina u uzorku. Na taj su način dobiveni Baždarni pravac 1 i Baždarni pravac 2, za kvantitativno određivanje sadržaja oleuropeina u ekstraktu lista masline (**Tablica 4**). Koncentracija internog standarda u baždarnim pravcima redom iznosi 4 mmol/dm^3 i $0,4\text{ mmol/dm}^3$.

Tablica 4. Koncentracije oleuropeina te pripadajući omjeri signala oleuropeina i siringaldehida pomoću kojih je dobiven Baždarni pravac 1 i Baždarni pravac 2 za kvantifikaciju oleuropeina u ekstraktu lista masline.

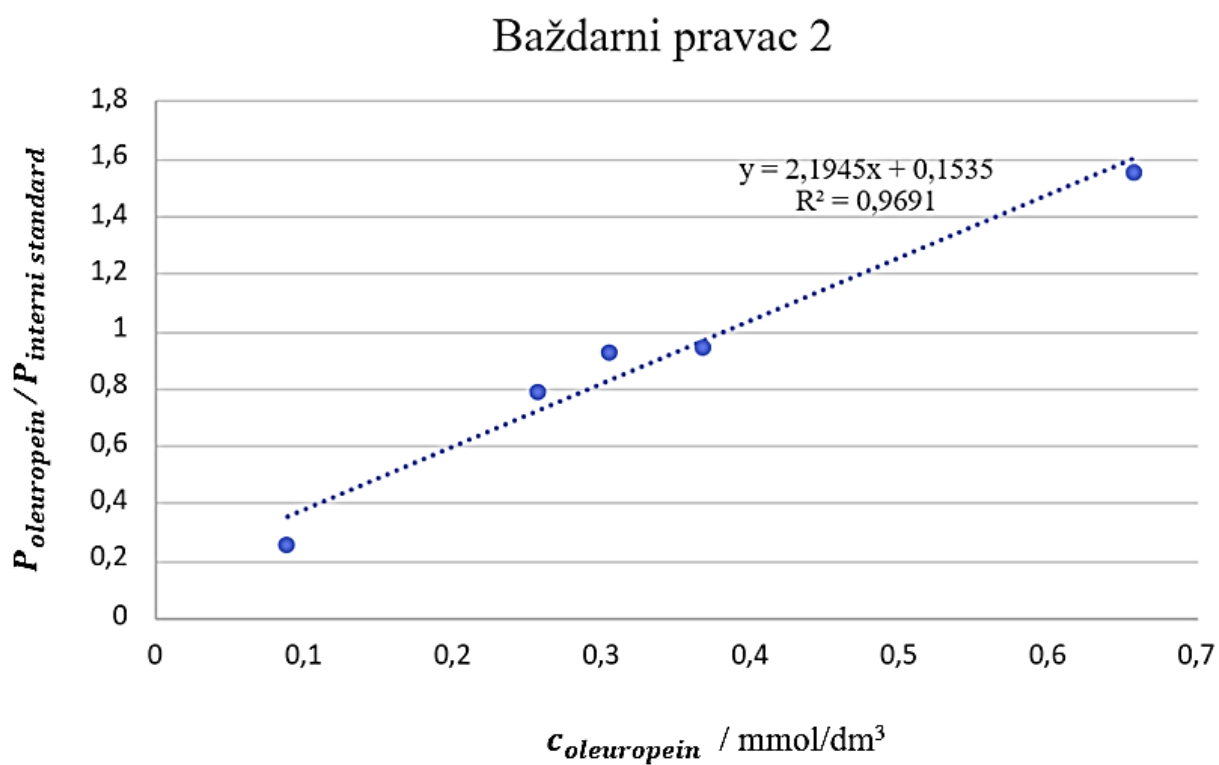
<i>Baždarni pravac 1</i>		<i>Baždarni pravac 2</i>	
$c\text{ (oleuropein) / mmol/dm}^3$	$P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$	$c\text{ (oleuropein) / mmol/dm}^3$	$P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$
0,20	0,0555	0,02	ND*
0,89	0,2302	0,09	0,2529
2,58	0,6096	0,26	0,788
3,05	0,7229	0,31	0,9216
3,68	0,9126	0,37	0,9373
6,58	1,4969	0,66	1,5513

*nije detektiran

Jednadžba Baždarnog pravca 1 jednaka je $y = 0,227x + 0,0286$, s pripadajućim koeficijentom korelacije $r^2 = 0,9975$ (**Slika 18**). Dobivena jednadžba Baždarnog pravca 2 jednaka je $y = 2,1945x + 0,1535$, s koeficijentom korelacije $r^2 = 0,9691$ (**Slika 19**).



Slika 18. Baždarni pravac 1 za kvantitativno određivanje oleuropeina u ekstraktu lista masline.



Slika 19. Baždarni pravac 2 za kvantitativno određivanje oleuropeina u ekstraktu lista masline.

4.3.2.2. ^1H NMR spektar ekstrakta lista masline

Provedena je kvantitativna analiza oleuropeina u ekstraktu lista masline primjenom ^1H NMR spektroskopije. Snimljeni su ^1H NMR spektri dvaju ekstrakata lista masline u dva jednaka primjerka. Pik oleuropeina na 5,95 ppm integriran je te stavljen u omjer s površinom internog standarda ($P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$). Budući da je koncentracija internog standarda u uzorcima iznosila 4 mmol/dm^3 , korišten je Baždarni pravac 1 za određivanje koncentracije oleuropeina u ekstraktima. Izračunan je sadržaj oleuropeina u ekstraktima lista masline (**Tablica 5**).

Tablica 5. Izračunane koncentracije oleuropeina pomoću Baždarnog pravca 1 u ekstraktima.

Oznaka ekstrakta od kojeg je pripremljen uzorak za kvantitativnu ^1H NMR analizu	$P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$	$C_{oleuropein}$ (u uzorku) / mmol dm^{-3}	$C_{oleuropein}$ (u ekstraktu) / $\text{mg/g suhog ekstrakta}$	$\bar{C}_{oleuropein}$ (u ekstraktu) / $\text{mg/g suhog ekstrakta}$
A1	1,8029	7,82	250,27	$279,95 \pm 29,68$
A2	2,0083	8,72	309,63	
B1	1,854	8,04	212,63	$234,66 \pm 22,02$
B2	1,823	7,91	256,69	

Dobivene koncentracije oleuropeina u uzorcima nešto su izvan raspona Baždarnog pravca 1, no moglo se pretpostaviti kako će se, u slučaju koncentracije oleuropeina u uzorku ekstrakta koja je istoga reda veličine kao i one korištene prilikom izrade baždarnog pravca, ovisnost omjera površine pikova oleuropeina i internog standarda o koncentraciji oleuropeina ponašati i u području izvan baždarnog pravca linearno, pa je prilikom izračuna istih korištena ekstrapolacija.

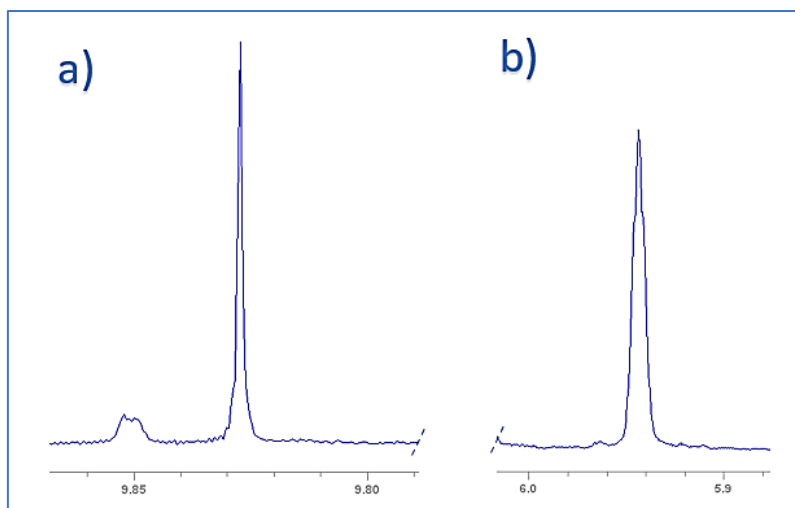
Budući da ekstrakti predstavljaju duplikat pripremljen od iste vrste lista masline, izračunata je srednja vrijednost koncentracije oleuropeina u suhom ekstraktu te vrste lista masline te pripadajuća relativna standardna devijacija, a koji redom iznose $279,95\text{ mg/g suhog}$

ekstrakta (RSD = 10,60 %) i 234,66 mg/g suhog ekstrakta (RSD = 9,38 %). Rezultati kvantitativne analize pokazali su da je sadržaj oleuropeina u ekstraktu lista masline u skladu s prethodno objavljenim podacima, prilikom čega se radi o višim vrijednostima dosad zabilježenima u istraživanjima, koja ne primjenjuju nužno ovu analitičku tehniku. Relativna standardna devijacija (~ 10 %) iznosom je u podudarnosti s literaturnom (12, 149), što potencijalno govori o tendenciji djelomične varijabilnosti u sadržaju navedenog spoja u listu masline uvjetovano okolišnim čimbenicima. Razlika u prosječnoj koncentraciji oleuropeina u dvjema vrstama lista masline, te pripadajuća RSD, pokazatelj su moguće identifikacije vrste analizom njezina kemijskog profila, što je već i ranije potvrđeno drugim analitičkim tehnikama (145).

4.3.2.3. Validacija metode

4.3.2.3.1. Selektivnost

Selektivnost, odnosno mogućnost analitičke metode da pouzdano razlikuje ciljni spoj od ostalih prisutnih spojeva u određenom uzorku ispitana je za oleuropein i siringaldehid (interni standard). Prema literaturi, karakterističan pik oleuropeina, koji je ujedno korišten za njegovo kvantitativno određivanje u plodovima masline, jest singlet na ~ 5,90 ppm, te pik siringaldehida na 9,81 ppm (157, 158, 177). Radi pouzdanije identifikacije navedenih spojeva u ^1H NMR spektru ekstrakta lista masline, snimljen je ^1H NMR spektar otopine standarda pojedinog spoja. Analizom ^1H NMR spektra ekstrakta lista masline utvrđeni su navedeni pikovi, koji su bili jasno razdvojeni od ostalih pikova u blizini, što je omogućilo njihovu nedvojbenu detekciju (**Slika 20**).



Slika 20. Karakterističan pik a) siringaldehida na 9,83 ppm i b) oleuropeina na 5,95 ppm. Vidljiva je dobra razlučivost navedenih pikova.

4.3.2.3.2. Linearnost

Linearnost, odnosno mogućnost analitičke metode da u određenom koncentracijskom rasponu daje analitički odgovor proporcionalan koncentraciji ispitivane tvari ispitana je izradom dvaju baždarnih pravaca pomoću šest standardnih otopina oleuropeina, u rasponu koncentracija 0,20 – 6,58 mmol/dm³ i 0,02 – 0,66 mmol/dm³. Prikazana je ovisnost omjera površine singleta oleuropeina i internog standarda ($P_{oleuropein}/P_{interni\ standard}$) o koncentraciji oleuropeina. Izrada baždarnih pravaca detaljnije je opisana u 4.3.2.1. Dobiveni Baždarni pravac 1 pokazao je visoki stupanj linearnosti u mjerenom području, s koeficijentom korelacije $r^2 = 0,9975$. Baždarni pravac 2 pokazao je nešto niži stupanj linearne ovisnosti, s koeficijentom korelacije $r^2 = 0,9691$. (**Tablica 6.**)

Tablica 6. Parametri linearnosti

	Područje linearnosti (mmol/dm ³)	Jednadžba pravca	r^2	S_a	S_b
oleuropein	0,20 – 6,58	$y = 0,227x + 0,0286$	0,9975	0,0057	0,0198
	0,02 – 0,66	$y = 2,1945x + 0,1535$	0,9691	0,2261	0,08678

Koeficijent korelacije Baždarnog pravca 1 u iznosu je viši u odnosu na vrijednost istoga dobivenu u istraživanjima koji se bave kvantifikacijom oleuropeina u ekstraktu lista masline (149), odnosno plodova masline (157), te određivanjem sadržaja sekoiridoida maslinovog ulja (133). Međutim, koeficijent korelacije Baždarnog pravca 2 niži je od literaturnog, što se može pripisati dodatnom koraku razrjeđivanja otopina standarda u postupku pripreme baždarnog pravca. Međutim, može se zaključiti kako oba regresijska modela osiguravaju visoku točnost interpretacije sadržaja oleuropeina u ovom biljnom matriksu.

4.3.2.3.3. Osjetljivost

Osjetljivost, odnosno mogućnost metode da malom promjenom koncentracije analita pokazuje izraženu promjenu u intenzitetu analitičkog signala, procijenjena je određivanjem granice detekcije (LOD), tj. najnižom koncentracijom analita kojom je moguće pouzdano detektirati signal, te granice kvantifikacije (LOQ), koja se definira kao najniža koncentracija analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnosti i preciznosti. LOD i LOQ su izračunani jednadžbama:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot sb}{a} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot sb}{a}$$

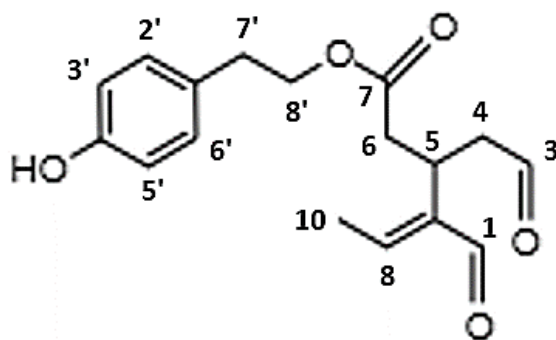
pri čemu su s_b standardno odstupanje odsječka pravca i a nagib pravca. Izračunani su LOD i LOQ za pojedini baždarni pravac pomoću navedenih parametara (**Tablica 7**).

Tablica 7. Granice detekcije i kvantifikacije

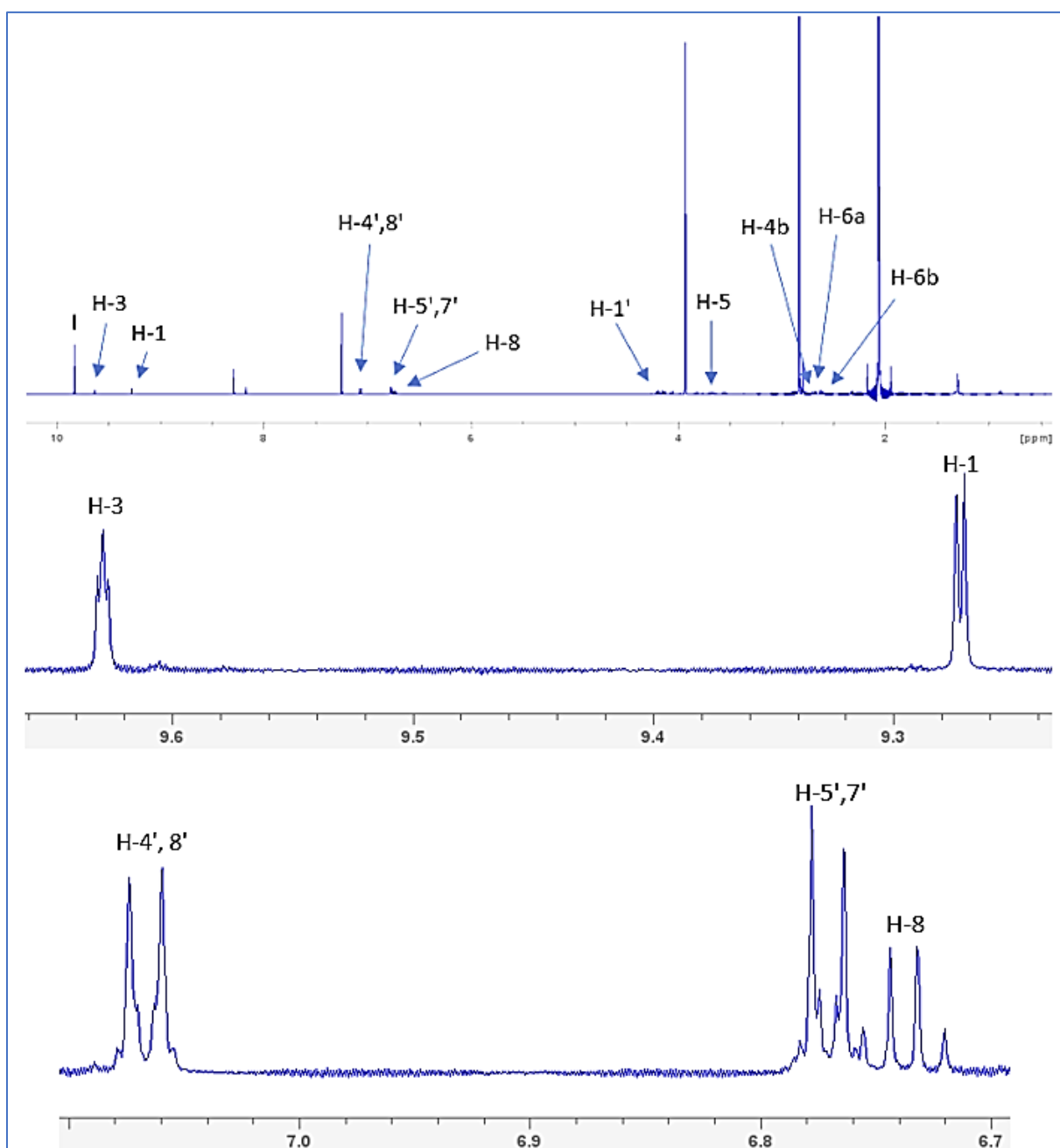
	<i>Jednadžba pravca</i>	LOD / mmoldm ⁻³	LOQ / mmoldm ⁻³
Oleuropein	$y = 0,227x + 0,0286$	0,29	0,87
	$y = 2,1945x + 0,1535$	0,13	0,40

4.3.3. Određivanje sadržaja oleokantala u ekstraktu lista masline

U svrhu točne identifikacije oleokantala (**Slika 21**) u ekstraktu lista masline, snimljen je ¹H NMR spektar standarda u acetonu-d₆, koncentracije 1,24 mmol/dm³ (**Slika 22**). U spektru su se mogli uočiti karakteristični pikovi oleokantala (**Tablica 8**).



Slika 21. Kemijska struktura oleokantala s označenim H atomima.



Slika 22. ^1H NMR spektar standarda oleokantala u acetonu- d_6 . Oznakom I označen je interni standard.

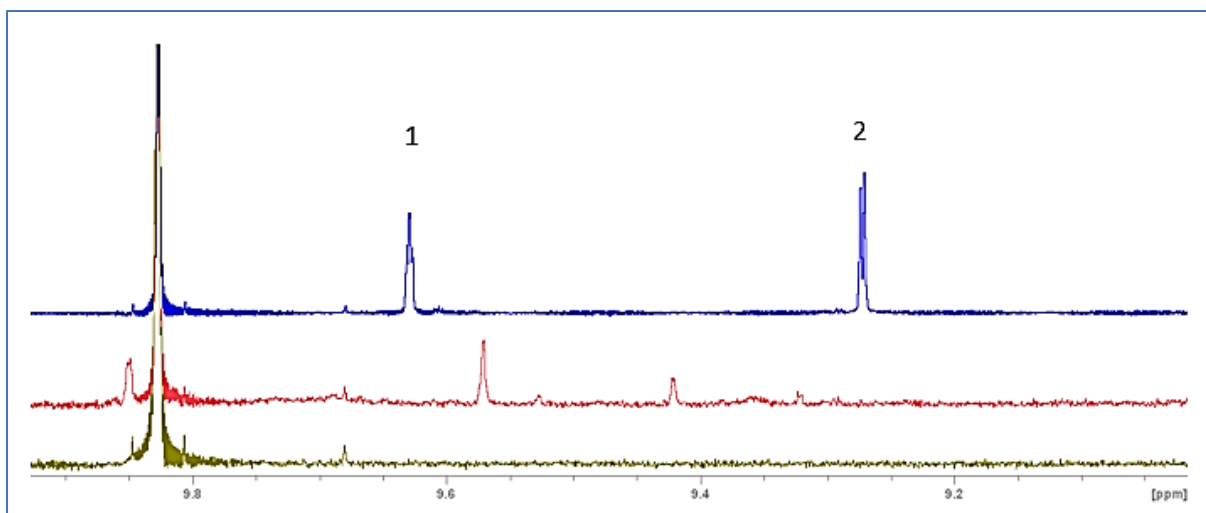
Među ostalim, jasno se mogao vidjeti karakterističan dublet oleokantala na 9,27 ppm, što se ponešto razlikuje od literaturnog na 9,23 ppm (119, 132, 133), odnosno 9,22 ppm (178, 179) no treba uzeti u obzir kako je kao otapalo, umjesto CDCl_3 , korišten aceton- d_6 , pa su određene varijacije u kemijskom pomaku bile i očekivane, pogotovo ako se uzme u obzir da su Esposito i sur.(177) koristeći kao NMR otapalo smjesu CD_3OD i fosfatnog pufera u D_2O (1:1) uočili dublet na 9,10 ppm. Također, mogao se uočiti singlet oleokantala na 9,63 ppm, čiji se pomak također malo razlikuje od literaturnog na 9,65 ppm (132, 133), odnosno na 9,62 ppm (178).

Tablica 8. Detektirani pikovi oleokantala u ^1H NMR spektru standardne otopine oleokantala u acetonu- d_6 .

H-1	H-3	H-4a	H-4b	H-5	H-6a	H-6b	H-8	H-1'	H-4',8'	H-5',7'
9,27 d, $J=2,0$ Hz	9,63 s	-	2,76 dd, $J=0,8$ Hz	3,67 m	2,68 m	2,61 m	6,74 q, $J=7,1$ Hz	4,20 m	7,07 d, $J=8,5$ Hz	6,77 d, $J=8,4$ Hz

s – singlet, d – dublet, q – kvartet, m – multiplet, dd – dupli dublet

U spektrima ekstrakata moglo se vidjeti kako na 9,27 i 9,63 ppm redom nema dubleta i singleta oleokantala (**Slika 23**). Time ni u jednom ekstraktu nije pronađen oleokantal, što nas dovodi do zaključka kako ovog spoja nema u listu masline ili je prisutan u toliko malim koncentracijama koje nisu detektibilne ^1H NMR spektroskopijom, te se može utvrditi kako je koncentracija oleokantala u svim uzorcima ekstrakata lista masline bila 0 mmol/dm^3 .



Slika 23. ^1H NMR spektar oleokantala (plavo), ekstrakta lista masline (crveno) i internog standarda (smeđe) u acetonu- d_6 u području 9,2 – 9,8 ppm. U ^1H spektru ekstrakta jasno je vidljivo kako singlet na 9,63 ppm (1) i dublet na 9,27 ppm (2) oleokantala nisu prisutni.

4.3.4. Identifikacija ostalih bioaktivnih fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline

4.3.4.1. Identifikacija sekoiridoida u području 9 - 10 ppm

Prema (119, 132, 133, 179), oleacein se može identificirati u ^1H NMR spektru pomoću singleta na 9,65 ppm i dubleta na 9,21 ppm, što se relativno malo razlikuje od kemijskog pomaka singleta i dubleta oleokantala u tom području. U spektrima svih ekstrakata može se uočiti kako je u području 9,60 – 9,80 ppm prisutan samo jedan singlet na 9,68 ppm koji pripada internom standardu. Budući da se kemijski pomak karakterističnog singleta i dubleta oleokantala u ^1H spektru snimljenog standarda ne razlikuje značajno od literaturnog, moglo se pretpostaviti da u ^1H spektru oleaceina snimanog u acetonu- d_6 , koji je strukturno vrlo sličan oleokantalu, također neće biti većih razlika u kemijskom pomaku. Prema tome, s velikom sigurnošću može se ustvrditi kako u ekstraktima lista masline nema oleaceina ili njegova iznimno mala koncentracija nije dostatna za detekciju ^1H NMR spektroskopijom.

Nadalje, u području 9 – 10 ppm vidljivi su određeni dubleti, pa su tako u ^1H NMR spektrima ekstrakata lista masline u acetonu- d_6 uočeni dubleti na 9,42 ppm, 9,84 ppm, 9,53 ppm i 9,32 ppm (**Slika 24**). Međutim, nije svaki spektar imao sve navedene dublete. Pretpostavlja se da ti dubleti pripadaju aldehidnim protonima drugih sekoiridoida prisutnih u ekstraktu lista masline (179), iako sama identifikacija istih u ovom biljnom materijalu, prema svim saznanjima, nije bila izvršena korištenjem ^1H NMR spektroskopije. Za razliku od toga, u

^1H spektru EVOO-a dokazano je da se u tom području, uz dublete oleokantala i oleaceina, nalaze dubleti aldehydnih protona drugih sekoiridoida (**Tablica 8**), kao što su oleuropein aglikon i ligstrozid aglikon (132, 133), čije je prisustvo u listu masline dokazano (39, 177), te oleokoronal, oleomisional, ligstrodiol, oleuropeindiol (181), elenolid (127, 182) i elenolinska kiselina (119) za koje nema podataka da su bili traženi u listu masline, niti su u istome ikad identificirani.

Tablica 8. Sažeti prikaz kemijskih pomaka (δ) pikova izraženih u ppm i odgovarajućih konstanti sprege (J) aldehydnih protona sekoiridoidnih spojeva prisutnih u EVOO-u prema podacima iz literature.

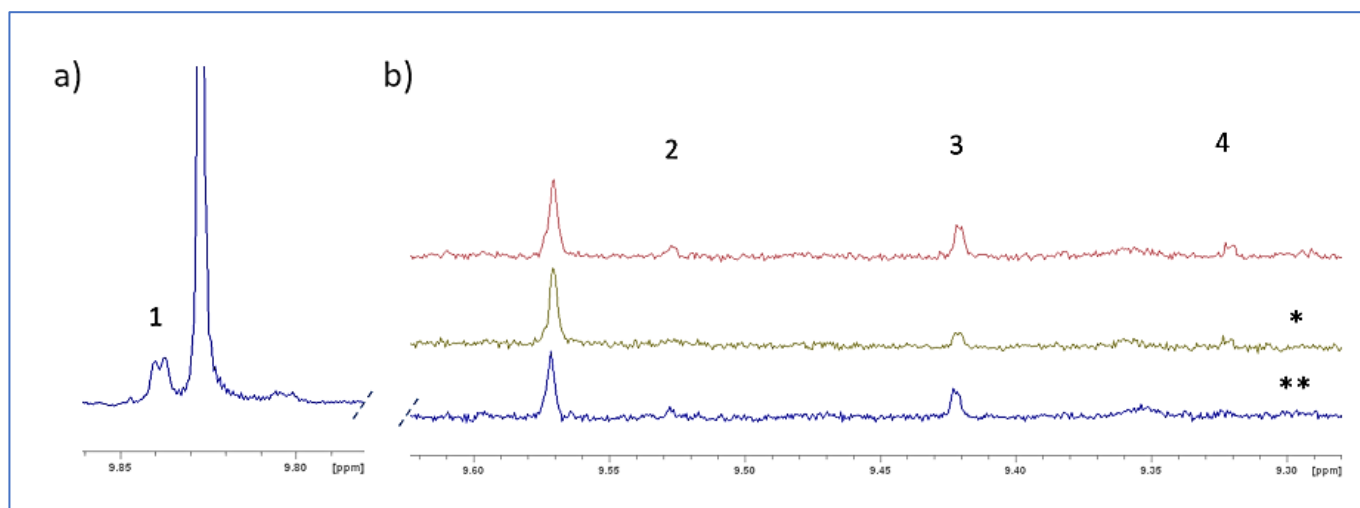
<i>oleuropein aglikon</i>	<i>ligstrozid aglikon</i>	<i>oleokoronal</i>	<i>oleomisional</i>	<i>ligstrodiol</i>	<i>oleuropeindiol</i>	<i>elenolid</i>	<i>elenolinska kiselina</i>
~9,52 d, $J=?$ Hz (132, 133)	~9,50 d; $J=?$ Hz (132, 133)	9,23 d, $J=1,7$ Hz (181)	9,17 d, $J=2,0$ Hz (181)	~9,21 d, $J=2,0$ Hz; 9,46(9,68)d, $J=2,7$ Hz (181)	9,17 d, $J=2,0$ Hz; 9,44(9,67) d, $J=2,7$ Hz (181)	9,27 d, $J=0,9$ Hz (127, 182)	9,64 d, $J=2,0$ Hz (119)

Budući da se zbog utjecaja samog otapala kemijski pomaci mogu djelomice razlikovati, relevantniji je podatak iznos konstanti sprege, čija su odstupanja u samom iznosu relativno rjeđa i mala (116, 183). Kako bi se predložila prisutnost spomenutih sekoiridoida (**Tablica 8**) u listu masline, a koji su potvrđeni u EVOO-u, uspoređene su konstante sprege između dubleta uočenih u ^1H NMR spektrima ekstrakata lista masline kemijskog pomaka 9,20 – 9,90 ppm i pikova koji pripadaju traženim sekoiridoidima te su potvrđeni u EVOO-u. Prosječne konstante sprege dubleta ustanovljenih u ekstraktima prikazane su u **Tablici 9**.

Tablica 9. Prosječni kemijski pomaci dubleta evidentiranih u ekstraktima lista masline u području spektralne širine 9,20 – 9,90 ppm i pripadajuće relativne standardne devijacije s odgovarajućom prosječnom konstantom sprege (J) i relativnom standardnom devijacijom.

$\bar{\delta} / \text{ppm}$	$RSD / \% (\delta)$	$\bar{J} / \text{Hz}$	$RSD / \% (J)$
9,32 d	0,08	1,71	5,79
9,42 d	0,08	1,03	5,14
9,53 d	0,10	0,85	7,59
9,84 d	0,10	1,58	5,65

Primijećeno je kako konstante sprege dubleta prisutnih u ekstraktima nisu u skladu s istovrsnim konstantama definiranih sekoiridoida EVOO-a, čime se može zaključiti kako traženih sekoiridoida EVOO-a nema u listu masline, ali valja napomenuti kako su daljnja istraživanja u konačnoj identifikaciji navedenih dubleta i dalje potrebna. Također, potrebno je naglasiti kako se, zbog nedostatka podataka o konstanti sprege dubleta svojstvenog oleuropein i ligstrozid aglikonu, ne može sa sigurnošću potvrditi odsutnost navedenih spojeva u ekstraktima lista masline, odnosno moguće je pretpostaviti da uočeni dublet na 9,53 ppm pripada upravo jednomu od ta dva spoja, a tomu ide u prilog već ranije dokazana njihova prisutnost u ovom biljnom materijalu. Međutim, s obzirom da nema podataka o kemijskom pomaku oleuropein i ligstrozid aglikona u acetonu- d_6 , nemoguće je sa sigurnošću utvrditi kojemu od ta dva spoja pripada.

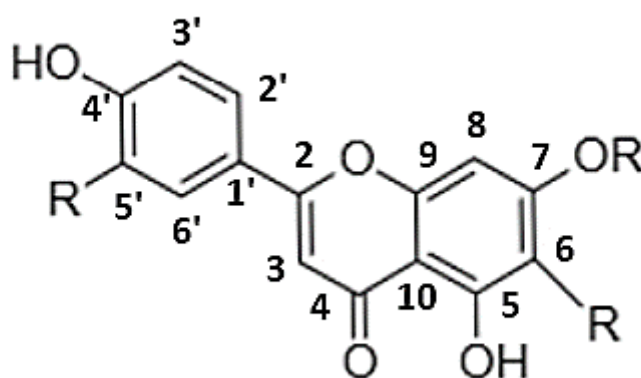


Slika 24. ^1H NMR spektri ekstrakata lista masline u acetonu- d_6 . a) Dublet na 9,84 ppm (1) i pik internog standarda na 9,83 ppm. b) Dubleti na 9,53 ppm (2), 9,42 ppm (3) i 9,32 ppm (4). U svim ekstraktima bio je prisutan dublet na 9,42 ppm, dok u nekima nije bio uočen dublet na 9,53 ppm (*), odnosno na 9,32 ppm (**).

4.3.4.2. Identifikacija flavonoida u ekstraktu lista masline

Poznato je da ekstrakt lista masline, osim već navedenih sekoiridoida, može sadržavati i bioaktivne spojeve koji pripadaju skupini flavonoida. Zbog njihova biomedicinskog značaja, koje je obrazloženo u poglavlju 1.1.2.3., cilj rada bilo je i provesti identifikaciju istih te time dodatno kvalitativno okarakterizirati ekstrakte lista masline. Kao što je već spomenuto, poznatim sastavom ekstrakata može se u daljnjim biološkim ispitivanjima utvrditi profil fenolnog ekstrakta koji ispoljava najučinkovitije bioaktivno djelovanje.

U svojoj strukturi (**Slika 25**), za razliku od ostalih spojeva prisutnih u ekstraktu lista masline, flavonoidi sadrže fenol (C-5 OH) čiji proton u ^1H NMR spektroskopiji rezonira u području 12 – 13 ppm (130). Stoga je područje 12 – 13 ppm ^1H NMR spektra ekstrakta lista masline karakteristično za flavonoide, te je važno provesti analizu istoga u identifikaciji navedenih spojeva.



Slika 25. Opća strukturna kemijska formula flavonoida uključenih u ovo istraživanje, s označenim C atomima.

Svi snimljeni ^1H NMR spektri ekstrakata lista masline sadržavali su signale u području 12 – 13 ppm, što je upućivalo na prisutnost flavonoida. Kao što je već uočeno i kod ^1H NMR signala karakterističnih za oleokantal, kemijski pomak pikova može biti nešto drukčiji ovisno o mediju u kojemu se spoj nalazi. Radi pouzdanije identifikacije odlučeno je ^1H NMR spektroskopijom snimiti spektar standarda flavonoida u acetonu- d_6 i zatim usporediti spektre s onima od ekstrakata. Pripravljeno je sedam standardnih otopina sljedećih flavonoida; luteolina, leuteolin 7-O-glukozida, luteolin 6-C-glukozida, apigenina, naringenina, miricetina i kempferola. *Standardne otopine navedenih flavonoida i uzorci za ^1H NMR snimanje pripremljeni su na način objašnjen u 3.2.1.3. i 3.2.2.2.*

U snimljenim ^1H NMR spektrima otopina pojedinog standarda mogli su se uočiti signali karakteristični za ispitani flavonoid (**Tablica 10**). Kemijski pomaci signala u skladu su s literaturom, uz prisutne manje varijacije (184 – 189). Tako je uočeno da kemijski pomaci za C-5 OH signal luteolina i apigenina iznose 13,03 ppm, dok se u literaturi navodi da je kemijski pomak C-5 OH singleta apigenina u iznosu manji (13,00 ppm u DMSO-d_6) (171) u odnosu na C-5 OH singlet luteolina (13,01 ppm u DMSO-d_6) (171). Također, pojedini flavonoidi pokazuju singlete koji nisu literaturno navedeni, zbog čega nije jasno kojim točno ^1H NMR atomima pripadaju. Tako naringenin pokazuje signal na 8,65 ppm, miricetin na 7,99 ppm i kempferol na 9,14 ppm. Unatoč tomu, može se pretpostaviti da pripadaju protonima fenolnih skupina budući da je riječ o singletima većeg kemijskog pomaka (130). Zanimljivo, u većini literature, izuzev C-5 OH singleta, nisu uočeni signali protona ostalih fenolnih skupina pojedinog flavonoida u ^1H NMR spektroskopiji. Međutim, Kontogianni i sur.(171) uočavaju signale protona drugih fenolnih skupina metodom ^1H NMR-a, kemijskog pomaka u području 8 – 13 ppm. Također, navode kako kemijski pomak protona fenolnih skupina (uključujući C-5

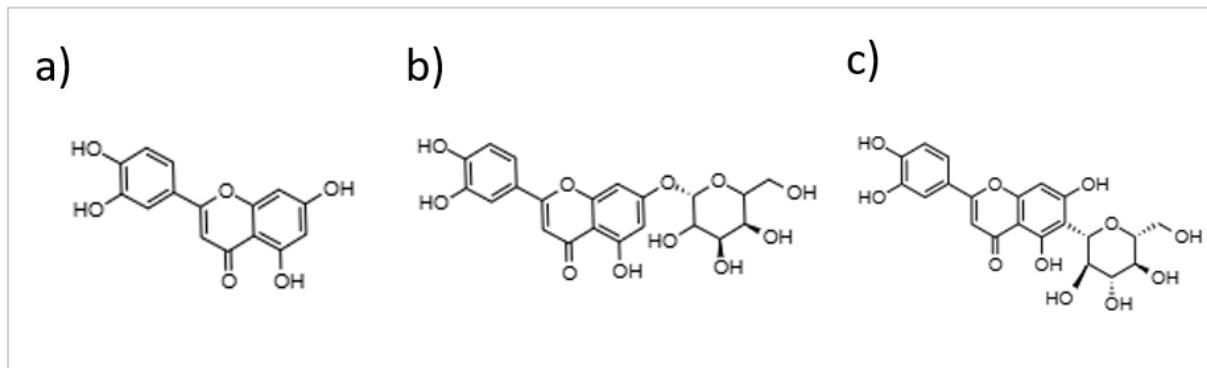
OH) uvelike ovisi o korištenom NMR otapalu. Tako bilježe signal C-5 OH kempferola te signale C-5' OH i C-6' OH oleuropeina redom na 12,45 ppm te 8,74 i 8,68 ppm u DMSO-d₆, dok u acetonu-d₆ redom na 12,19 ppm te 7,75 i 7,73 ppm, što je u skladu s utvrđenim kemijskim pomakom C-5 OH singleta kempferola te C-5' OH i C-6' OH singleta oleuropeina (prikazano u 4.3.1.1.) ovoga istraživanja. Snimljeni ¹H spektar otopine standarda miricetina u acetonu-d₆ sadržavao je C-5 OH singlet na 12,17 ppm, što u literaturi nije još zabilježeno budući da navedeni spoj, prema svim saznanjima, nije sniman u acetonu-d₆, već postoji samo podatak njegovog kemijskog pomaka u DMSO-d₆, na 12,52 ppm (171).

Tablica 10. Signali u ¹H NMR spektru otopine pojedinog flavonoida u acetonu-d₆ (ppm).

	luteolin	luteolin 7-O-glukozid	luteolin 6-C-glukozid	apigenin*	naringenin*	miricetin	kempferol*
C-5 OH	13,03 s	13,00 s	-	13,03 s	12,19 s	12,17 s	12,19 s
H-2	-	-	-	-	5,96 dd	-	-
H-2',6'	7,49 m	7,51 m	7,50 m	7,96 d, <i>J</i> =8,8 Hz	7,40 d, <i>J</i> =8,6 Hz	7,43 s	8,17 d, <i>J</i> =8,9 Hz
H-5' (i H-3' kod *)	7,01 d, <i>J</i> =8,4 Hz	7,02 d, <i>J</i> =8,4 Hz	7,01 d, <i>J</i> =8,4 Hz	7,04 d, <i>J</i> =8,8 Hz	6,91 d, <i>J</i> =8,6 Hz	-	7,03 d, <i>J</i> =8,9 Hz
H-3	6,59 s	6,65 s	6,62 s	6,65 s	-	-	-
H-8	6,53 d, <i>J</i> =2,2 Hz	6,81 d, <i>J</i> =2,2 Hz	6,53 s	6,55 d, <i>J</i> =2,1 Hz	-	6,52 d, <i>J</i> =2,0 Hz	6,55 d, <i>J</i> =2,1 Hz
H-6	6,26 d, <i>J</i> =2,1 Hz	6,44 d, <i>J</i> =2,2 Hz	-	6,27 d, <i>J</i> =2,0 Hz	-	6,27 d, <i>J</i> =2,1 Hz	6,28 d, <i>J</i> =2,1 Hz
H-1"	-	5,17 d, <i>J</i> =7,6 Hz	4,99 d, <i>J</i> =9,8 Hz	-	-	-	-
(?-OH)	-	-	13,59 s	-	8,65 s	7,99 s	9,14 s

Dobiveni kemijski pomak C-5 OH singleta luteolina i luteolin 7-O-glukozida vrlo je sličan (13,03 i 13,00 ppm redom), što je u skladu s literaturom (190). Može se zaključiti kako se glukoza vezana O-glikozidnom vezom na C-7 luteolina ne nalazi u kemijskoj okolini

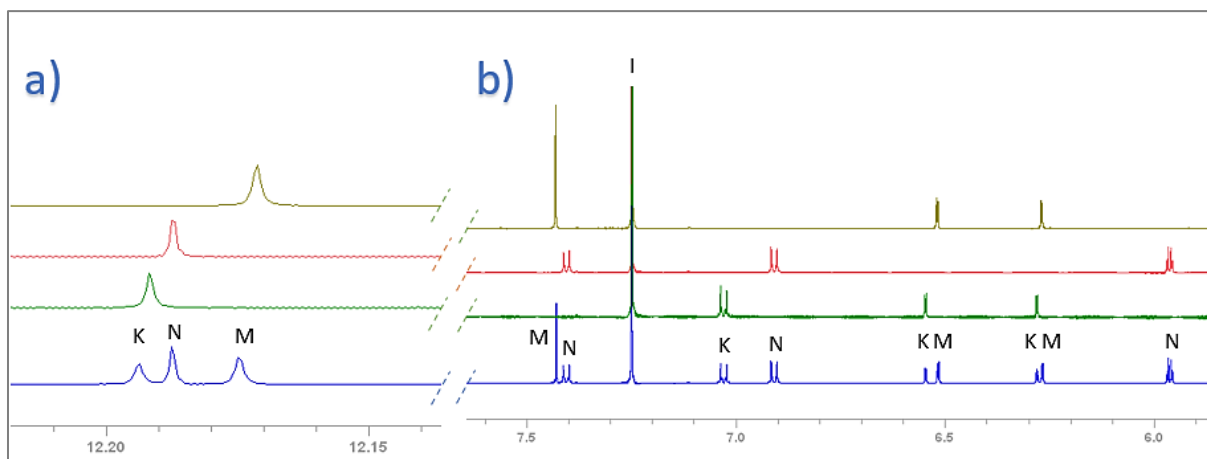
fenolne skupine vezane na C-5 budući da se kemijski pomak protona navedene fenolne skupine gotovo ne mijenja. Međutim, kako bi se potvrdio utjecaj mjesta vezanja glukoze na zasjenjenost protona C-5 OH skupine, snimljeni su i uspoređeni ^1H NMR spektri luteolin 7-O-glukozida i luteolina s luteolin 6-C-glukozidom (**Slika 26**), čija prisutnost u listu masline nije zabilježena. U ^1H NMR spektru luteolin 6-C-glukozida mogao se uočiti singlet na 13,59 ppm, dok je područje oko 13,00 ppm bilo bez vidljivih signala. Prema svim saznanjima, nema podataka o kemijskom pomaku signala koji potječu od protona fenolnih skupina luteolin 6-C-glukozida u ^1H NMR spektru navedenog spoja. Unatoč tomu, uzevši u obzir uočene signale drugih protona, čiji je kemijski pomak u skladu s literaturnim (191), te samu strukturu molekule, može se pretpostaviti kako singlet potječe od C-5 OH ili C-7 OH skupine luteolin 6-C-glukozida. Ako se radi o C-5 OH skupini, postoji mogućnost da je potencijalni nastanak vodikove veze između hidroksilne skupine glukoze i fenola uzrokovao, zbog elektron odvlačećeg efekta, veću izloženost protona vanjskom magnetskom polju, i time veći kemijski pomak signala (192). Ipak, za točnu potvrdu o kojem je protonu riječ potrebna su daljnja istraživanja. Međutim, može se zaključiti kako mjesto vezanja glukoze ima utjecaja na prisutnost/kemijski pomak signala C-5 OH skupine luteolina.



Slika 26. Strukturna kemijska formula a) luteolina, b) luteolin 7-O-glukozida i c) luteolin 6-C-glukozida.

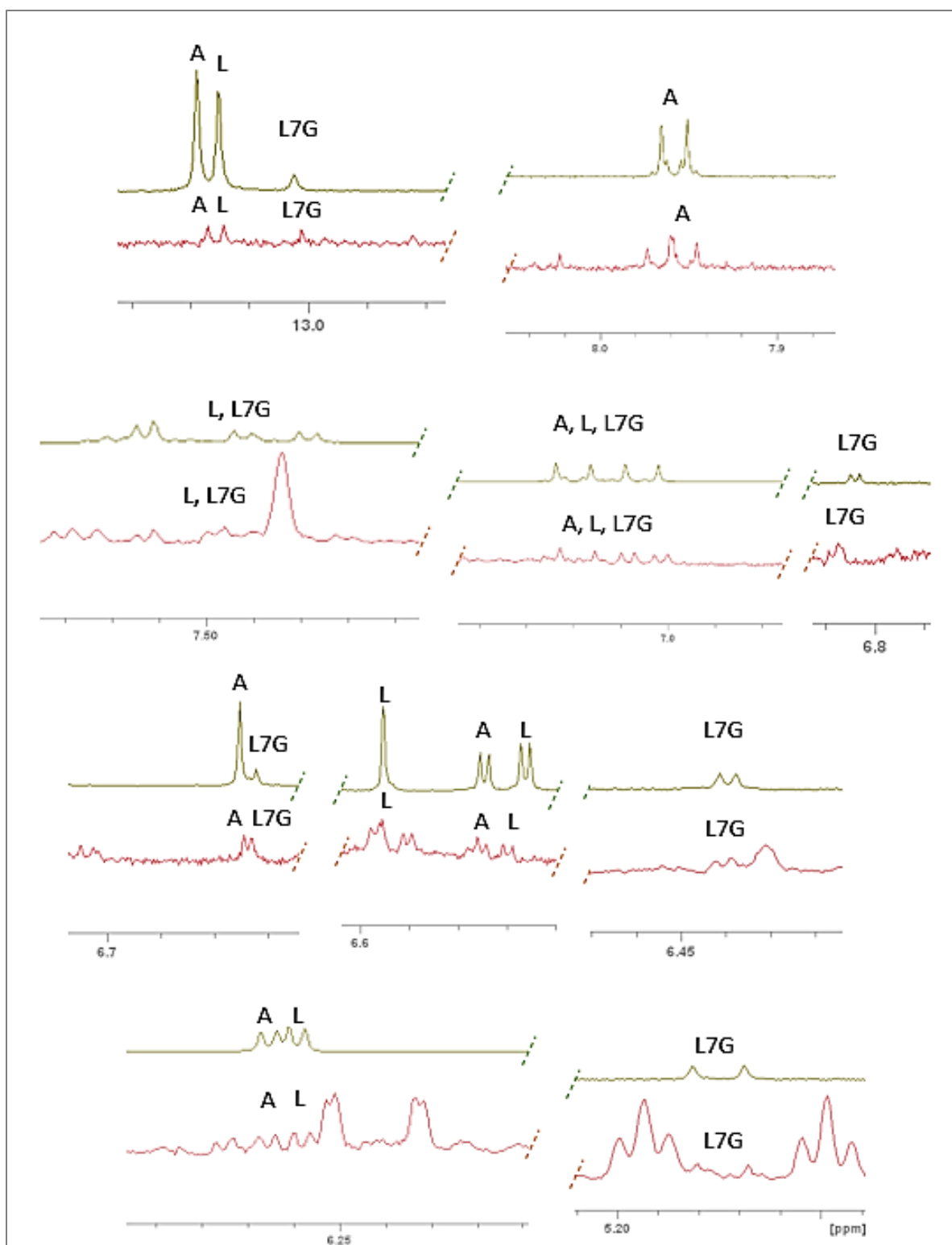
Nadalje, relativno je mali broj istraživanja u kojima su u ekstraktu lista masline flavonoidi identificirani metodom ^1H NMR spektroskopije. U velikoj većini tih istraživanja, identifikacija flavonoida izvršena je nakon što su spojevi ekstrakta lista masline odvojeni nekom vrstom tekućinske kromatografije, stoga je svaki flavonoid sniman zasebno. Pokazalo se kako spektri ekstrakata lista masline sadrže više C-5 OH singleta u području oko 13,00 ppm, čija je međusobna razlika u kemijskom pomaku vrlo mala, najčešće 0,01 – 0,02 ppm, što govori o prisutnosti većeg broja različitih flavonoida u ekstraktu. Otopine standarda flavonoida pokazale su kako pojedini flavonoidi imaju pikove sličnog kemijskog pomaka.

Budući da u literaturi identifikacija većine flavonoida nije nikad provedena u smjesi flavonoida ili u samome ekstraktu, u ovome istraživanju rađene su i određene kombinacije standarda flavonoida kako bi se utvrdilo utječe li na identifikaciju pojedinog flavonoida prisutnost drugih flavonoida čiji pikovi imaju slični kemijski pomak. Snimljeni su ^1H NMR spektri sljedećih smjesa standarda u acetonu- d_6 : luteolina i apigenina; luteolina, luteolin 7-O-glukozida i luteolin 6-C-glukozida; luteolina, luteolin 7-O-glukozida, luteolin 6-C-glukozida i apigenina; miricetina i naringenina; miricetina, naringenina i kempferola. U svim snimljenim ^1H NMR spektrima pripremljenih kombinacija bili su prisutni svi pikovi pojedinog flavonoida koji su se mogli uočiti i u ^1H NMR spektru otopine standarda pojedinog flavonoida. Kemijski pomak pikova pojedinog flavonoida ostao je nepromijenjen, a u određenim slučajevima promijenio se za $\pm 0,01$ ppm. Nadalje, izuzev preklapanja H-2',6' i H-5' signala flavonoida u kombinaciji luteolina, luteolin 7-O-glukozida, luteolin 6-C-glukozida (i apigenina), pikovi ispitanih spojeva bili su jasno razlučivi, što je omogućilo identifikaciju svih prisutnih flavonoida u svakoj kombinaciji (**Slika 27**). Ovakav model potvrdio je kako je moguće identificirati flavonoid u čijoj se kemijskoj okolini nalaze drugi flavonoidi sličnog kemijskog pomaka, što je od značaja za identifikaciju istih u ekstraktu lista masline jer se može pretpostaviti kako do preklapanja signala neće doći ni u takvom mediju.



Slika 27. ^1H NMR spektar otopine standarda miricetina (smeđe), naringenina (crveno), kempferola (zeleno) i smjese navedenih flavonoida (plavo), a) u području $\sim 12,2$ ppm i b) $6 - 7,5$ ppm. U potonjem spektru mogu se vidjeti jasno razlučivi signali kempferola (K), naringenina (N) i miricetina (M). Oznakom I označen je pik internog standarda.

Konačno, provedena je identifikacija flavonoida u ^1H NMR spektrima ekstrakata lista masline. Utvrđena je prisutnost luteolin 7-O-glukozida, luteolina i apigenina u ekstraktu lista masline (**Slika 28**) (**Tablica 11**). Kempferol, naringenin i miricetin nisu identificirani ni u jednom ekstraktu. U literaturi vrlo je česta, gotovo neizostavna, identifikacija luteolin 7-O-glukozida u fenolnom ekstraktu lista masline, dok su ostali spojevi identificirani u pojedinim kvalitativnim analizama ekstrakta lista masline. Prema tome, dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjima koja su utvrdila prisutnost flavonoida korištenjem drugih analitičkih tehnika (39, 51 – 53).



Slika 28. ^1H NMR spektar smjese luteolina, luteolin 7-O-glukozida, luteolin 6-C-glukozida i apigenina (smeđe) te ekstrakta lista masline (crveno) u acetonu- d_6 , s označenim pikovima luteolina (L), luteolin 7-O-glukozida (L7G) i apigenina (A).

Tablica 11. Detektirani pikovi luteolina, luteolin 7-O-glukozida i apigenina u ¹H NMR spektru ekstrakta lista masline u acetonu-d₆.

	luteolin	luteolin 7-O- glukozid	apigenin*
C-5 OH	13,03 s	13,00 s	13,04 s
H-2',6'	7,51 m	7,51 m	7,96 d, $J=8,8$ Hz
H-5' (i H-3' kod *)	7,01 d	7,01 d	7,04 d
H-3	6,59 s	6,65 s	6,65 s
H-8	6,54 d, $J=2,2$ Hz	6,81 d, $J=2,2$ Hz	6,55 d, $J=2,1$ Hz
H-6	6,26 d, $J=2,1$ Hz	6,44 d, $J=2,2$ Hz	6,27 d, $J=2,0$ Hz
H-1"	-	5,18 d, $J=7,6$ Hz	-

Tablica 12. Signali u ¹H NMR spektru otopine smjese luteolina i apigenina u acetonu-d₆ (ppm).

	luteolin	apigenin*
C-5 OH	13,02 s	13,02 s
H-2',6'	7,49 m	7,95 d, $J=8,8$ Hz
H-5' (i H-3' kod *)	7,01 d, $J=8,4$ Hz	7,04 d, $J=8,8$ Hz
H-3	6,59 s	6,65 s
H-8	6,53 d, $J=2,0$ Hz	6,55 d, $J=2,2$ Hz
H-6	6,26 d, $J=2,1$ Hz	6,26 d, $J=2,0$ Hz
H-1"	-	-

Tablica 13. Signali u ¹H NMR spektru otopine smjese luteolina, luteolin 7-O-glukozida i luteolin 6-C-glukozida u acetonu-d6 (ppm).

	luteolin	luteolin 7- O- glukozid	luteolin 6- C- glukozid
C-5 OH	13,03 s	13,00 s	-
H-2',6'	7,50 m	7,50 m	7,50 m
H-5'	7,02 d	7,02 d	7,02 d
H-3	6,59 s	6,65 s	6,61 s
H-8	6,53 d, <i>J</i> =2,2 Hz	6,81 d, <i>J</i> =2,2 Hz	6,52 s
H-6	6,26 d, <i>J</i> =2,1 Hz	6,44 d, <i>J</i> =2,2 Hz	-
H-1"	-	5,17 d, <i>J</i> =7,6 Hz	4,99 d, <i>J</i> =9,8 Hz
(?-OH)	-	-	13,59 s

Tablica 14. Signali u ¹H NMR spektru otopine smjese luteolina, luteolin 7-O-glukozida, luteolin 6-C-glukozida i apigenina u acetonu-d6 (ppm).

	luteolin	luteolin 7- O- glukozid	luteolin 6- C- glukozid	apigenin*
C-5 OH	13,03 s	13,01 s	-	13,04 s
H-2',6'	7,50 m	7,50 m	7,50 m	7,96 d, <i>J</i> =8,8 Hz
H-5' (i	7,01 d	7,01 d	7,01 d	7,04 d

H-3' kod *)				
H-3	6,59 s	6,64 s	6,61 s	6,65 s
H-8	6,53 d, <i>J</i> =2,2 Hz	6,81 d, <i>J</i> =2,2 Hz	6,52 s	6,55 d, <i>J</i> =2,1 Hz
H-6	6,26 d, <i>J</i> =2,1 Hz	6,44 d, <i>J</i> =2,2 Hz	-	6,26 d, <i>J</i> =2,0 Hz
H-1"	-	5,18 d, <i>J</i> =7,6 Hz	4,99 d, <i>J</i> =9,8 Hz	-
(?-OH)	-	-	13,60 s	-

Tablica 15. Signali u ¹H NMR spektru otopine smjese naringenina i miricetina u acetonu-d₆ (ppm).

	naringenin	miricetin
C-5 OH	12,19 s	12,17 s
H-2	5,96 dd	-
H-2',6'	7,41 d, <i>J</i> =8,6 Hz	7,43 s
H-5',3'	6,91 d, <i>J</i> =8,6 Hz	-
H-8	-	6,52 d, <i>J</i> =2,0 Hz
H-6	-	6,27 d, <i>J</i> =2,1 Hz
(?-OH)	8,57 s	7,99 s

Tablica 16. Signali u ^1H NMR spektru otopine smjese naringenina, miricetina i kempferola u acetonu- d_6 (ppm).

	naringenin	miricetin	kempferol
C-5 OH	12,19 s	12,17 s	12,19 s
H-2	5,96 dd	-	-
H-2',6'	7,40 d, $J=8,6$ Hz	7,43 s	8,17 d, $J=8,9$ Hz
H-5',3'	6,91 d, $J=8,6$ Hz	-	7,03 d, $J=8,9$ Hz
H-8	-	6,52 d, $J=2,0$ Hz	6,55 d, $J=2,1$ Hz
H-6	-	6,27 d, $J=2,1$ Hz	6,28 d, $J=2,1$ Hz
(?-OH)	8,67 s	-	9,16 s

5. ZAKLJUČCI

Uz primjenu ^1H NMR spektroskopije provedena je analiza ekstrakata lista masline. Usporedbom ^1H NMR spektara otopine standarda oleuropeina i ekstrakta lista masline identificiran je oleuropein u ekstraktu lista masline. Oleuropein je identificiran i u ^{13}C te 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru ekstrakta lista masline, usporedbom sa spektrom standardne otopine. Prema dostupnim podacima iz literature, većina uočenih korelacija za oleuropein nije dosad zabilježena.

U svrhu kvantifikacije oleuropeina u ekstraktu lista masline ^1H NMR spektroskopijom, odabran je njegov singlet na 5,95 ppm. Izrađeni su baždarni pravci za određivanje oleuropeina u rasponu koncentracija 0,2 i 6,58 mmol/dm³ te 0,02 i 0,66 mmol/dm³, koristeći siringaldehid kao interni standard. Jednadžba prvog baždarnog pravca jednaka je $y = 0,227x + 0,0286$, a drugog baždarnog pravca $y = 2,1945x + 0,1535$. U okviru validacijskog postupka ispitana je selektivnost, linearnost i osjetljivost metode. Selektivnost metode procijenjena je na temelju razlučivosti singleta oleuropeina i siringaldehida odabranih za određivanje sadržaja oleuropeina, pri čemu su pikovi bili jasno odvojeni od ostalih u okolini. Linearnost je potvrđena visokim koeficijentom korelacije ($r^2_1 = 0,9975$, $r^2_2 = 0,9691$), niskim standardnim odstupanjem nagiba i odsjeka, što ukazuje na dobru linearnu povezanost u području 0,20 – 6,58 mmol/dm³, odnosno 0,02 – 0,66 mmol/dm³. Određena je granica detekcije LOD = 0,13 mmol/dm³ i granica određivanja LOQ = 0,40 mmol/dm³. Kvantitativnom ^1H NMR spektroskopijom određen je sadržaj oleuropeina u ekstraktima dviju različitih vrsta lista masline. Prosječna koncentracija oleuropeina u ekstraktima iznosila je 280 (RSD = 10,60%) te 235 (RSD = 9,38 %) mg/g suhog ekstrakta. Koncentracije se nalaze unutar viših literaturno zabilježenih vrijednosti.

Provedena je usporedna analiza s ciljem odabira optimalnog NMR otapala. Uspoređeni su ^1H NMR spektri ekstrakta lista masline i otopine standarda oleuropeina u acetonu-d₆ i metanolu-d₄, pri čemu se aceton-d₆ pokazao kao bolje otapalo s obzirom na veću rezoluciju svih signala u spektru. Također, ^1H NMR spektar ekstrakta lista masline snimljen u acetonu-d₆ sadržavao je C-5 OH signal flavonoida, te je ^1H NMR spektar otopine standarda oleuropeina sadržavao C-5' OH i C-6' OH signale budući da u acetonu-d₆, kao neprotičnom otapalu, ne dolazi do protonске izmjene.

Analizom ^1H NMR spektra standardne otopine oleokantala i ekstrakta lista masline u području 9,20 – 9,70 ppm-a, utvrđeno je da u ekstraktu lista masline nema oleokantala. Također, usporedbom s kemijskim pomacima oleaceina u ^1H NMR u literaturi (119, 132), utvrđeno je da u ekstraktu lista masline nema oleaceina. Postoji mogućnost da su oleokantal i oleacein prisutni u količini ispod limita detekcije ove metode.

U ^1H spektru ekstrakta lista masline uočeni su dubleti kemijskog pomaka 9 – 10 ppm. Usporedbom konstanti sprege navedenih dubleta s literaturnim konstantama sprege dubleta najčešćih sekoiridoidnih derivata EVOO-a, utvrđeno je da uočeni dubleti ne predstavljaju signal sekoiridoida, s iznimkom jednog signala za koji postoji vjerojatnost da pripada oleuropein aglikonu ili ligstrozid aglikonu. Međutim, prisutni signal nije moguće jednoznačno povezati s jednim od tih dvaju spojeva jer nema literaturnih podataka o njihovom kemijskom pomaku u acetonu- d_6 .

Analizirani su ^1H NMR spektri standarda flavonoida, assignirani su pikovi i određene konstante sprezanja. Usporedbom sa standardnim spektrima identificirani su luteolin 7-O-glukozid, luteolin i apigenin u ekstraktu lista, te utvrđeno odsustvo kempferola, naringenina i miricetina. Analizirani su ^1H NMR spektri smjesa flavonoida i utvrđeno je da istovremena prisutnost većeg broja flavonoida sa signalima sličnog kemijskog pomaka ne ometa međusobno njihovu identifikaciju. Analizom ^1H NMR spektara luteolina, luteolin 7-O-glukozida i luteolin 6-C-glukozida utvrđeno je da ovisno o mjestu vezanja glukoze na luteolin, C-5 OH singlet može imati različit kemijski pomak, što u literaturi nije još zabilježeno.

6. ZAHVALA

Želimo izraziti najiskreniju zahvalnost mentorici, izv. prof. dr. sc. Cvijeti Jakobušić Brala, na stručnom vodstvu, prenesenom znanju, strpljenju i spremnosti na pomoć tijekom cijelog procesa izrade ovog rada te na motivaciji za daljnji rad u znanosti.

Srdačno zahvaljujemo prof. dr. sc. Moniki Barbarić na ustupljenim uzorcima ekstrakta lista masline te na dragocjenoj pomoći i suradnji.

Duboko zahvaljujemo djelatnicama BIOCENTRA d.o.o. na pomoći i podršci tijekom istraživanja. Posebnu zahvalnost upućujemo dr. sc. Mariji Lovrić i dr. sc. Aniti Šporec, direktoricama tvrtke, koje su omogućile ostvarenje suradnje, te Jasni Jakovljević, dipl. ing., i Aniti Rustan, tehničkoj suradnici, na praktičnoj pomoći pri izradi ekstrakata lista masline.

Zahvaljujemo svim članovima Zavoda za Fizikalnu kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pruženoj pomoći.

Veliku zahvalnost dugujemo svojoj obitelji na podršci.

Posebnu zahvalnost želimo iskazati majci, na ljubavi.

7. POPIS LITERATURE

1. Lammi, C. et al. Virgin Olive Oil Extracts Reduce Oxidative Stress and Modulate Cholesterol Metabolism: Comparison between Oils Obtained with Traditional and Innovative Processes. *Antioxidants* 9, 798 (2020).
2. Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J. & Keast, R. S. J. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 218–236 (2008).
3. Ronca, C. L. et al. Olive Oil Waste as a Source of Functional Food Ingredients: Assessing Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in Olive Leaves. *Foods* 13, 189 (2024).
4. Ghanem, M. T. M., Tawfik, W. A., Mahdy, E. S. M., Abdelgawad, M. E., Abdel-Azim, N. S. & El-Missiry, M. M. Chemical and biological evaluation of olive leaves as a waste by-product of olive oil industry. *Egyptian Pharmaceutical Journal* 18, 172–177 (2019).
5. Palmeri, R. et al. Olive Leaves, a Promising Byproduct of Olive Oil Industry: Assessment of Metabolic Profiles and Antioxidant Capacity as a Function of Cultivar and Seasonal Change. *Agronomy* 12, 2007 (2022).
6. Erbay, Z. & Icier, F. The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International* 26, 319–334 (2010).
7. Kusuma, I. Y., Habibie, H., Bahar, Muh. A., Budán, F. & Csupor, D. Anticancer Effects of Secoiridoids—A Scoping Review of the Molecular Mechanisms behind the Chemopreventive Effects of the Olive Tree Components Oleocanthal, Oleacein, and Oleuropein. *Nutrients* 16, 2755 (2024).
8. Dekanski, D. et al. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *J Serb Chem Soc* 74, 367–377 (2009).
9. Romani, A. et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* 11, 1776 (2019).
10. Pereira, A. P. et al. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* 12, 1153–1162 (2007).
11. Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A. & Segura-Carretero, A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* 77, 92–108 (2015).
12. Talhaoui, N. et al. Phenolic compounds and in vitro immunomodulatory properties of three Andalusian olive leaf extracts. *Journal of Functional Foods* 22, 270–277 (2016).
13. Kiritsakis, K. et al. Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *J Americ Oil Chem Soc* 87, 369–376 (2010).

14. Ko, K.-W., Kang, H. J. & Lee, B. Y. Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities of Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extracts. *Food Science and Biotechnology* 18, 818–821 (2009).
15. Ferdousi, F., Araki, R., Hashimoto, K. & Isoda, H. Olive leaf tea may have hematological health benefit over green tea. *Clinical Nutrition* 38, 2952–2955 (2019).
16. Saibandith, B., Spencer, J., Rowland, I. & Commane, D. Olive Polyphenols and the Metabolic Syndrome. *Molecules* 22, 1082 (2017).
17. Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž. & Hrnčič, M. K. Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules* 25, 5946 (2020).
18. Otero, D. M. et al. Oleuropein: Methods for extraction, purifying and applying. *Rev. Ceres* 67, 315–329 (2020).
19. Mallamaci, R. et al. Olive Tree in Circular Economy as a Source of Secondary Metabolites Active for Human and Animal Health Beyond Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules* 26, 1072 (2021).
20. Di Stefano, V. & Melilli, M. G. Effect of storage on quality parameters and phenolic content of Italian extra-virgin olive oils. *Natural Product Research* 34, 78–86 (2020).
21. Kalogeropoulos, N. & Tsimidou, M. Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants* 3, 387–413 (2014).
22. Serreli, G., Boronat, A., De La Torre, R., Rodriguez-Moratò, J. & Deiana, M. Cardiovascular and Metabolic Benefits of Extra Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Mechanistic Insights from In Vivo Studies. *Cells* 13, 1555 (2024).
23. Obied, H. K. et al. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J. Agric. Food Chem.* 53, 823–837 (2005).
24. Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M. & Jakobušić Brala, C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules* 24, 2001 (2019).
25. Omar, S. H. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 111–121 (2010).
26. Da Porto, A. et al. The Pivotal Role of Oleuropein in the Anti-Diabetic Action of the Mediterranean Diet: A Concise Review. *Pharmaceutics* 14, 40 (2021).
27. Janahmadi, Z., Nekooeian, A. A., Moaref, A. R. & Emamghoreishi, M. Oleuropein Offers Cardioprotection in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Cardiovasc Toxicol* 15, 61–68 (2015).

28. Manna, C. et al. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 461–466 (2004).
29. Mohamed, N. A., Abdou, H. M. & Marzouk, M. M. Antidiabetic and Immunomodulatory Effects of Oleuropein and Vitamin C in Diabetic Male Rats. *JAB* 11, 2250–2268 (2018).
30. Arulappen, A. L. et al. The correlation between antibiotic usage and antibiotic resistance: a 3-year retrospective study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15, 1608921 (2025).
31. Baran, A., Kwiatkowska, A. & Potocki, L. Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *IJMS* 24, 5777 (2023).
32. Angilè, F. et al. Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) Metabolic Profiles Discriminate Two Monovarietal Extra Virgin Olive Oils, Cultivars Arbequina and Koroneiki, with Different Geographical Origin. *Horticulturae* 9, 66 (2023).
33. Karagiannis, T. C. et al. Investigation of the Anti-Inflammatory Properties of Bioactive Compounds from *Olea europaea*: In Silico Evaluation of Cyclooxygenase Enzyme Inhibition and Pharmacokinetic Profiling. *Molecules* 29, 3502 (2024).
34. Segura Palacios, J. M. et al. Topical treatment with oleocanthal extract in reducing inflammatory reactions after photodynamic therapy: a prospective quasi-experimental pilot study. *Complementary Therapies in Medicine* 42, 298–301 (2019).
35. Papakonstantinou, A. et al. New Affordable Methods for Large-Scale Isolation of Major Olive Secoiridoids and Systematic Comparative Study of Their Antiproliferative/Cytotoxic Effect on Multiple Cancer Cell Lines of Different Cancer Origins. *IJMS* 24, 3 (2022).
36. Parkinson, L. & Keast, R. Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease. *IJMS* 15, 12323–12334 (2014).
37. Emma, M. R. et al. Potential Uses of Olive Oil Secoiridoids for the Prevention and Treatment of Cancer: A Narrative Review of Preclinical Studies. *IJMS* 22, 1234 (2021).
38. Francioso, A. et al. Green Route for the Isolation and Purification of Hyrdoxytyrosol, Tyrosol, Oleacein and Oleocanthal from Extra Virgin Olive Oil. *Molecules* 25, 3654 (2020).
39. Abbattista, R., Ventura, G., Calvano, C. D., Cataldi, T. R. I. & Losito, I. Bioactive Compounds in Waste By-Products from Olive Oil Production: Applications and Structural Characterization by Mass Spectrometry Techniques. *Foods* 10, 1236 (2021).
40. Gutiérrez-Miranda, B. et al. Treatment with the Olive Secoiridoid Oleacein Protects against the Intestinal Alterations Associated with EAE. *IJMS* 24, 4977 (2023).
41. Cuffaro, D., Bertini, S., Macchia, M. & Digiaco, M. Enhanced Nutraceutical Properties of Extra Virgin Olive Oil Extract by Olive Leaf Enrichment. *Nutrients* 15, 1073 (2023).

42. Mehmood, A., Usman, M., Patil, P., Zhao, L. & Wang, C. A review on management of cardiovascular diseases by olive polyphenols. *Food Science & Nutrition* 8, 4639–4655 (2020).
43. Musa, A. et al. Antiulcer Potential of *Olea europaea* L. cv. Arbequina Leaf Extract Supported by Metabolic Profiling and Molecular Docking. *Antioxidants* 10, 644 (2021).
44. Pacifico, S. et al. Differential Radiomodulating Action of *Olea europaea* L. cv. Caiazzana Leaf Extract on Human Normal and Cancer Cells: A Joint Chemical and Radiobiological Approach. *Antioxidants* 11, 1603 (2022).
45. Hansen, K. et al. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* 2, 319–325 (1996).
46. González-Hedström, D. et al. Olive leaf extract supplementation improves the vascular and metabolic alterations associated with aging in Wistar rats. *Sci Rep* 11, 8188 (2021).
47. Gentile, L. & Uccella, N. A. Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. Var. Coratina) by LC-MS. *Food Research International* 55, 128–136 (2014).
48. Breakspear, I. & Guillaume, C. A Quantitative Phytochemical Comparison of Olive Leaf Extracts on the Australian Market. *Molecules* 25, 4099 (2020).
49. Khalid, M., Saeed-ur-Rahman, Bilal, M. & Huang, D. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. *Journal of Integrative Agriculture* 18, 211–230 (2019).
50. Panou, A. A. & Karabagias, I. K. Olive Leaf Extracts as a Medicinal Beverage: Origin, Physico-Chemical Properties, and Bio-Functionality. *Beverages* 11, 66 (2025).
51. El, S. N. & Karakaya, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews* 67, 632–638 (2009).
52. Laguerre, M. et al. Characterization of Olive-Leaf Phenolics by ESI-MS and Evaluation of their Antioxidant Capacities by the CAT Assay. *J Americ Oil Chem Soc* 86, 1215–1225 (2009).
53. Khelouf, I., Karoui, I. J., Lakoud, A., Hammami, M. & Abderrabba, M. Comparative chemical composition and antioxidant activity of olive leaves *Olea europaea* L. of Tunisian and Algerian varieties. *Heliyon* 9, e22217 (2023).
54. Del Bo', C. et al. Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? *Nutrients* 11, 1355 (2019).
55. Han, R.-M., Zhang, J.-P. & Skibsted, L. H. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. *Molecules* 17, 2140–2160 (2012).

56. Ciumărnean, L. et al. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules* 25, 4320 (2020).
57. Rees, A., Dodd, G. & Spencer, J. The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients* 10, 1852 (2018).
58. Bellavite, P. Neuroprotective Potentials of Flavonoids: Experimental Studies and Mechanisms of Action. *Antioxidants* 12, 280 (2023).
59. De Andrade Teles, R. B. et al. Flavonoids as Therapeutic Agents in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: A Systematic Review of Preclinical Evidences. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 7043213 (2018).
60. Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A. & Bernatoniene, J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* 12, 457 (2020).
61. Murithi, M. et al. Molecular mechanisms of flavonoids and their modulatory effects against breast cancer: A scoping review. *F1000Res* 11, 293 (2022).
62. Pyo, Y., Kwon, K. H. & Jung, Y. J. Anticancer Potential of Flavonoids: Their Role in Cancer Prevention and Health Benefits. *Foods* 13, 2253 (2024).
63. Gajender, Mazumder, A., Sharma, A. & Azad, Md. A. K. A Comprehensive Review of the Pharmacological Importance of Dietary Flavonoids as Hepatoprotective Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2023, 4139117 (2023).
64. Zhang, Z. et al. Research Progress on the Antibacterial Activity of Natural Flavonoids. *Antibiotics* 14, 334 (2025).
65. Caporali, S. et al. Anti-Inflammatory and Active Biological Properties of the Plant-Derived Bioactive Compounds Luteolin and Luteolin 7-Glucoside. *Nutrients* 14, 1155 (2022).
66. Nadalin, P., Kim, J. K. & Park, S. U. Recent insights into luteolin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal*; 23:Doc787; ISSN 1611-2156 (2024)
67. Škerget, M. et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89, 191–198 (2005).
68. Park, C. M. & Song, Y.-S. Luteolin and luteolin-7- O -glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract* 7, 423 (2013).
69. Aziz, N., Kim, M.-Y. & Cho, J. Y. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology* 225, 342–358 (2018).
70. Luo, Y., Shang, P. & Li, D. Luteolin: A Flavonoid that Has Multiple Cardio-Protective Effects and Its Molecular Mechanisms. *Front. Pharmacol.* 8, 692 (2017).

71. Zhang, W. et al. Luteolin intake is negatively associated with all-cause and cardiac mortality among patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 15, 59 (2023).
72. Zang, Y., Igarashi, K. & Li, Y. Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7- O -glucoside on KK- A y mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80, 1580–1586 (2016).
73. Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., Alharbi, H. O. A., Khan, A. A. & Rahmani, A. H. Effects and Mechanisms of Luteolin, a Plant-Based Flavonoid, in the Prevention of Cancers via Modulation of Inflammation and Cell Signaling Molecules. *Molecules* 29, 1093 (2024).
74. Yao, C. et al. Luteolin as a potential hepatoprotective drug: Molecular mechanisms and treatment strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 167, 115464 (2023).
75. Shanmugam, S. et al. Effects of luteolin and quercetin 3- β -d-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 1278–1285 (2016).
76. Ding, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of luteolin isolated from *Lophatherum gracile* Brongn. against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Front. Pharmacol.* 15, 1430564 (2024).
77. De Stefano, A. et al. Anti-Inflammatory and Proliferative Properties of Luteolin-7-O-Glucoside. *IJMS* 22, 1321 (2021).
78. Rehfeldt, S. C. H. et al. Neuroprotective Effect of Luteolin-7-O-Glucoside against 6-OHDA-Induced Damage in Undifferentiated and RA-Differentiated SH-SY5Y Cells. *IJMS* 23, 2914 (2022).
79. Sezen Karaoğlu, E., Hancı, H., Koca, M. & Kazaz, C. Some Bioactivities of Isolated Apigenin-7-O-glucoside and Luteolin-7-O-glucoside. *Applied Sciences* 13, 1503 (2023).
80. Zhou, L. et al. Simultaneous optimization of extraction and antioxidant activity from *Blumea laciniata* and the protective effect on Hela cells against oxidative damage. *Arabian Journal of Chemistry* 13, 9231–9242 (2020).
81. Park, K. et al. Inhibitory Effect of Luteolin 4'- O -Glucoside from *Kummerowia striata* and Other Flavonoids on Interleukin-5 Bioactivity. *Planta Med* 65, 457–459 (1999).
82. Pasković, I. et al. Silicon Foliar Fertilisation Ameliorates Olive Leaves Polyphenolic Compounds Levels and Elevates Its Potential towards Different Cancer Cells. *Applied Sciences* 14, 4669 (2024).
83. De Oliveira, D. P. et al. Exploring the bioactivity potential of *Leonotis nepetifolia* : phytochemical composition, antimicrobial and antileishmanial activities of extracts from different anatomical parts. *Natural Product Research* 35, 3120–3125 (2021).

84. Siddiquee, R. et al. Apigenin unveiled: an encyclopedic review of its preclinical and clinical insights. *Discov. Plants* 2, 11 (2025).
85. Salehi, B. et al. The therapeutic potential of apigenin. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1305 (2019).
86. Hasnat, H. et al. Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. *Heliyon* 10, e27533 (2024).
87. Wang, C. et al. Apigenin as an emerging hepatoprotective agent: current status and future perspectives. *Front. Pharmacol.* 15, 1508060 (2024).
88. Wang, M., Firman, J., Liu, L. & Yam, K. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota. *BioMed Research International* 2019, 1–18 (2019).
89. Wang, W. et al. Efficiency comparison of apigenin-7-O-glucoside and trolox in antioxidative stress and anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 72, 1645–1656 (2020).
90. Ahmed, S. et al. Molecular Docking and Dynamics Simulation of Natural Compounds from Betel Leaves (*Piper betle* L.) for Investigating the Potential Inhibition of Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase of Type 2 Diabetes. *Molecules* 27, 4526 (2022).
91. Li, M. et al. Integrating Zebrafish Model to Screen Active Ingredients and Network Pharmacology Methods to Explore the Mechanism of *Lavandula angustifolia* Therapy for Alzheimer's Disease. *ChemistrySelect* 7, e202201364 (2022).
92. Liu, M.-M. et al. Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer HeLa cells. *Food and Chemical Toxicology* 146, 111843 (2020).
93. Aghababaei, F. & Hadidi, M. Recent Advances in Potential Health Benefits of Quercetin. *Pharmaceuticals* 16, 1020 (2023).
94. Salehi, B. et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega* 5, 11849–11872 (2020).
95. Bidzhieva, A. & Chiriapkin, A. Review of the Biological Activity of Rutin: Antidiabetic, Antioxidant, Anti-inflammatory and Antitumor. *Bulletin of Science and Practice* 48–57 (2023)
96. Rahmani, S., Naraki, K., Roohbakhsh, A., Hayes, A. W. & Karimi, G. The protective effects of rutin on the liver, kidneys, and heart by counteracting organ toxicity caused by synthetic and natural compounds. *Food Science & Nutrition* 11, 39–56 (2023).
97. Chunmei, Z. & Shuai, W. Molecular mechanisms of neuroprotective effect of rutin. *Front. Pharmacol.* 16, 1599167 (2025).

98. Feng, Y. et al. Rutin-Associated Hepatoprotection: A Review of Mechanisms and Therapeutic Prospects. *Basic Clin Pharma Tox* 136, e70042 (2025).
99. Ganeshpurkar, A. & Saluja, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* 25, 149–164 (2017).
100. Wójciak, M. et al. Antioxidant Potential of Diosmin and Diosmetin against Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Molecules* 27, 8232 (2022).
101. Ahmad, T., Khan, T., Kirabo, A. & Shah, A. J. Antioxidant Flavonoid Diosmetin Is Cardioprotective in a Rat Model of Myocardial Infarction Induced by Beta 1-Adrenergic Receptors Activation. *CIMB* 45, 4675–4686 (2023).
102. Kim, M. S. et al. Neuroprotective Effect of Halophyte *Salicornia herbacea* L. Is Mediated by Activation of Heme Oxygenase-1 in Mouse Hippocampal HT22 Cells. *Journal of Medicinal Food* 20, 140–151 (2017).
103. Ning, R. et al. Diosmetin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis through STAT3/c-Myc signaling pathway in human osteosarcoma cells. *Biol Res* 54, 40 (2021).
104. Wang, C. et al. Cytoprotective effects of diosmetin against hydrogen peroxide-induced L02 cell oxidative damage via activation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Med Report* (2018)
105. Almatroodi, S. A. & Rahmani, A. H. Unlocking the Pharmacological Potential of Myricetin Against Various Pathogenesis. *IJMS* 26, 4188 (2025).
106. Nadalin, P., Kim, J. K. & Park, S. U. Recent studies on myricetin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal*; 22:Doc1223; ISSN 1611-2156 (2023)
107. Lv, H. et al. The hepatoprotective effect of myricetin against lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced fulminant hepatitis. *International Journal of Biological Macromolecules* 155, 1092–1104 (2020).
108. Salehi, B. et al. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals* 12, 11 (2019).
109. Duda-Madej, A., Stecko, J., Sobieraj, J., Szymańska, N. & Kozłowska, J. Naringenin and Its Derivatives—Health-Promoting Phytobiotic against Resistant Bacteria and Fungi in Humans. *Antibiotics* 11, 1628 (2022).
110. Mansour, L. A. H. et al. Hepatoprotective and Neuroprotective Effects of Naringenin against Lead-Induced Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *Biomedicines* 11, 1080 (2023).
111. Cai, J. et al. Naringenin: A flavanone with anti-inflammatory and anti-infective properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 164, 114990 (2023).

112. Alrumaihi, F. et al. Pharmacological Potential of Kaempferol, a Flavonoid in the Management of Pathogenesis via Modulation of Inflammation and Other Biological Activities. *Molecules* 29, 2007 (2024).
113. Hussain, M. S. et al. Kaempferol: Paving the path for advanced treatments in aging-related diseases. *Experimental Gerontology* 188, 112389 (2024).
114. Niziński, P., Krajewska, A., Oniszczyk, T., Polak, B. & Oniszczyk, A. Hepatoprotective Effect of Kaempferol—A Review. *Molecules* 30, 1913 (2025).
115. Periferakis, A. et al. Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. *IJMS* 23, 15054 (2022).
116. Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 3rd edn, (Elsevier, 2016).
117. Olmo-Cunillera, A. et al. NMR spectroscopy: a powerful tool for the analysis of polyphenols in extra virgin olive oil. *J Sci Food Agric* 100, 1842–1851 (2020).
118. Christophoridou, S. & Dais, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 633, 283–292 (2009).
119. Angelis, A., Antoniadis, L., Stathopoulos, P., Halabalaki, M. & Skaltsounis, L. A. Oleocanthalic and Oleaceinic acids: New compounds from Extra Virgin Olive Oil (EVOO). *Phytochemistry Letters* 26, 190–194 (2018).
120. Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J. & Garrido, A. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3535–3540 (1999).
121. Khallouki, F. et al. Isolation of the Major Phenolic Compounds in the Pits of Brined Green Olive Drupes: Structure Elucidation by Comprehensive $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy. *Natural Product Communications* 14, 1934578X19857365 (2019).
122. Christophoridou, S., Dais, P., Tseng, L.-H. & Spraul, M. Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). *J. Agric. Food Chem.* 53, 4667–4679 (2005).
123. Dais, P. & Boskou, D. Detection and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oil, Olives, and Biological Fluids. in *Olive Oil* (ed. Boskou, D.) 55–107 (CRC Press, 2008).
124. Rongai, D. et al. ^1H NMR and Multivariate Analysis for Geographic Characterization of Commercial Extra Virgin Olive Oil: A Possible Correlation with Climate Data. *Foods* 6, 96 (2017).

125. Ingallina, C. et al. Extra-Virgin Olive Oils from Nine Italian Regions: An ¹H NMR-Chemometric Characterization. *Metabolites* 9, 65 (2019).
126. Klikarová, J. et al. The Phenolic Fraction of Italian Extra Virgin Olive Oils: Elucidation Through Combined Liquid Chromatography and NMR Approaches. *Food Anal. Methods* 12, 1759–1770 (2019).
127. Rigakou, A., Diamantakos, P., Melliou, E. & Magiatis, P. S -(E)-Elenolide: a new constituent of extra virgin olive oil. *J Sci Food Agric* 99, 5319–5326 (2019).
128. Del Coco, L. et al. Following the olive oil production chain: 1D and 2D NMR study of olive paste, pomace, and oil. *Euro J Lipid Sci & Tech* 116, 1513–1521 (2014).
129. Mannina, L. et al. Nuclear magnetic resonance study of flavoured olive oils. *Flavour & Fragrance J* 27, 250–259 (2012).
130. Charisiadis, P., Primikyri, A., Exarchou, V., Tzakos, A. & Gerothanassis, I. P. Unprecedented Ultra-High-Resolution Hydroxy Group ¹H NMR Spectroscopic Analysis of Plant Extracts. *J. Nat. Prod.* 74, 2462–2466 (2011).
131. Tsolis, T. et al. NMR Analysis of Extra Virgin Olive Oil of the Epirus Region of Greece with Emphasis on Selected Phenolic Compounds. *Molecules* 29, 1111 (2024).
132. Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. & Magiatis, P. Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers. *J. Agric. Food Chem.* 62, 600–607 (2014).
133. Kugić, A. Kvantitativna ¹H NMR analiza sekoiridoidnih fenolnih spojeva i masnih kiselina u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline. [nagrađeni studentski rad – Rektorova nagrada]. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2020).
134. Martín-García, B. et al. Comparative Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves Using a Sonotrode and an Ultrasonic Bath and the Evaluation of Both Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Antioxidants* 11, 558 (2022).
135. Talhaoui, N. et al. Determination of phenolic compounds of ‘Sikitita’ olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive leaves. *LWT - Food Science and Technology* 58, 28–34 (2014).
136. Al-Rimawi, F. Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves. *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 285–289 (2014).

137. Martínez-Navarro, E. M. et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for determination of oleuropein and other bioactive compounds in olive leaf by-products. *J Sci Food Agric* 101, 1447–1453 (2021).
138. Duque-Soto, C., Quirantes-Piné, R., Borrás-Linares, I., Segura-Carretero, A. & Lozano-Sánchez, J. Characterization and Influence of Static In Vitro Digestion on Bioaccessibility of Bioactive Polyphenols from an Olive Leaf Extract. *Foods* 11, 743 (2022).
139. Martín-García, B. et al. Comparative Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves Using a Sonotrode and an Ultrasonic Bath and the Evaluation of Both Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Antioxidants* 11, 558 (2022).
140. Mir-Cerdà, A., Granados, M., Saurina, J. & Sentellas, S. Green Extraction of Antioxidant Compounds from Olive Tree Leaves Based on Natural Deep Eutectic Solvents. *Antioxidants* 12, 995 (2023).
141. Quirantes-Piné, R. et al. A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72, 121–126 (2013).
142. Razola-Díaz, M. D. C., Sevenich, R., Schlüter, O. K., Verardo, V. & Gómez-Caravaca, A. M. Improving Olive Leaf Phenolic Extraction with Pulsed Electric Field Technology Pre-Treatment. *Foods* 14, 368 (2025).
143. Tóth, G. et al. Phenolic profiling of various olive bark-types and leaves: HPLC–ESI/MS study. *Industrial Crops and Products* 67, 432–438 (2015).
144. Alqarni, M. H. et al. Assessment of seasonal variation of the bioactive oleuropein in *Olea europaea* L. leaves cultivated in Saudi Arabia. *ACHrom* 34, 297–303 (2022).
145. Ugolini, T. et al. Seasonal and Cultivar-Dependent Phenolic Dynamics in Tuscan Olive Leaves: A Two-Year Study by HPLC-DAD-MS for Food By-Product Valorization. *Separations* 12, 192 (2025).
146. Mir-Cerdà, A., García-García, R., Granados, M., Sentellas, S. & Saurina, J. Exploring polyphenol content in olive leaf waste: effects of geographical, seasonal and varietal differences. *Microchemical Journal* 215, 114347 (2025).
147. Mourn Training Services. *How long does it take to equilibrate a column on an HPLC system before the first injection can be performed?* <https://mourntrainingservices.com/how-long-to-equilibrate-an-hplc-column/> (pristupljeno 26. kolovoza 2025).
148. Iowa State University. *NMR Sample Preparation Tutorial*. <https://www.cif.iastate.edu/nmr/nmr-tutorials/sample-preparation> (pristupljeno 26. kolovoza 2025).

149. Charisiadis, P., Kontogianni, V. G., Tsiafoulis, C. G., Tzakos, A. G. & Gerothanassis, I. P. Determination of Polyphenolic Phytochemicals using Highly Deshielded –OH ¹H-NMR Signals. *Phytochemical Analysis* 28, 159–170 (2017).
150. Marino, S. et al. Antioxidant Activity and Chemical Components as Potential Anticancer Agents in the Olive Leaf (*Olea europaea* L. cv Leccino.) Decoction. *ACAMC* 14, 1376–1385 (2014).
151. Goulas, V. et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition Food Res* 53, 600–608 (2009).
152. Kontogianni, V. G. et al. Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. *Journal of Medicinal Food* 16, 817–822 (2013).
153. Zhang, J., Huang, X., Sun, X., Pei, D. & Di, D. Efficient method for the screening and identification of anti-diabetic components in the leaves of *Olea europaea* L. *New J. Chem.* 38, 3796–3802 (2014).
154. Wang, X., Li, C., Liu, Y., Li, H. & Di, D. Efficient method for screening and identification of radical scavengers in the leaves of *Olea europaea* L. *Biomedical Chromatography* 25, 373–380 (2011).
155. Gariboldi, P., Jommi, G. & Verotta, L. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry* 25, 865–869 (1986).
156. UK Health Security Agency. Picric acid: properties and incident management. (2014; ažurirano 2025). <https://www.gov.uk/government/publications/picric-acid-properties-and-incident-management> (pristupljeno 27. kolovoza 2025).
157. Mousouri, E., Melliou, E. & Magiatis, P. Isolation of Megaritolactones and Other Bioactive Metabolites from ‘Megaritikiki’ Table Olives and Debittering Water. *J. Agric. Food Chem.* 62, 660–667 (2014).
158. Koudounas, K. et al. Silencing of Oleuropein β -Glucosidase Abolishes the Biosynthetic Capacity of Secoiridoids in Olives. *Front. Plant Sci.* 12, (2021).
159. Hassen, I., Casabianca, H. & Hosni, K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *Journal of Functional Foods* 18, 926–940 (2015).
160. Monika Barbarić – publikacija u pripremi
161. Worley, B. & Powers, R. Simultaneous phase and scatter correction for NMR datasets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 131, 1–6 (2014).

162. Amin, N. & Claridge, T. Quantitative NMR Spectroscopy (University of Oxford, NMR Facility, Nov 2017). <https://www.slideshare.net/slideshow/quantitative-nmr/109155934> (pristupljeno 27. kolovoza 2025.)
163. Hou, Y., Wang, J. & Cheng, L.L. Quantitative NMR studies of multiple compound mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 102–103, 1–20 (2017).
164. Dietrich, W., Rüdel, C. H. & Neumann, M. Fast and precise automatic baseline correction of one- and two-dimensional NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance* 91, 1–11 (1991).
165. Simon, B. & Köstler, H. Improving the sensitivity of FT-NMR spectroscopy by apodization weighted sampling. *J. Biomol. NMR* 73, 155–165 (2019).
166. Wu, Y.-S., Li, B.-X. & Long, Y.-Y. Rapid quantitative ^1H – ^{13}C two-dimensional NMR with high precision. *RSC Adv.* 12, 5349–5356 (2022).
167. Bruker Avance Beginners Guide, Solvent Selection, Bruker NMR tutorial (priv. vodič), (n.d.). [Avance Beginners Guide - Solvent Selection](#) (pristupljeno 28. kolovoza 2025.)
168. Doe, A. et al. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues. *Food Chem.* 150, 35–41 (2014).
169. Günther, H. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3rd edn. Wiley-VCH (2013), Ch. 4.
170. Welton, C., Raval, P., Trébosc, J. & Manjunatha Reddy, G. N. Chemical exchange of labile protons by deuterium enables selective detection of pharmaceuticals in solid formulations. *Chemical Communications* 58, 11551–11554 (2022).
171. Kontogianni, V. G., Charisiadis, P., Primikyri, A., Pappas, C. G., Exarchou, V., Tzakos, A. G. & Gerothanassis, I. P. Hydrogen bonding probes of phenol –OH groups. *Org. Biomol. Chem.* 11, 1013–1025 (2013).
172. Konno, K., Yasui, H., Hirayama, C. & Shinbo, H. Glycine Protects Against Strong Protein-Denaturing Activity of Oleuropein, a Phenolic Compound in Privet Leaves. *J. Chem. Ecol.* 24, 735–751 (1998).
173. Mourtzinou, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A. & Karathanos, V. T. Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8088–8094 (2007).
174. Damtoft, S., Franzyk, H. & Jensen, S. R. Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*. *Phytochemistry* 31, 4197 (1992).

175. Madison Metabolomics Consortium (Jofre, F., Anderson, M. E. & Markley, J. L.) Syringaldehyde. BMRB Metabolomics Database bmse000595 [bmse000595 Syringaldehyde at BMRB](#) (pristupljeno 28. kolovoza 2025.)
176. Yi, B. et al. Antioxidant Phenolic Compounds of Cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Molecules* 16, 10157–10167 (2011).
177. Esposito, A. et al. Phytochemical Characterization of *Olea europaea* L. Cultivars of Cilento National Park (South Italy) through NMR-Based Metabolomics. *Molecules* 26, 3845 (2021).
178. Calò, F. et al. ¹H-NMR Profiling Shows as Specific Constituents Strongly Affect the International EVOO Blends Characteristics: The Case of the Italian Oil. *Molecules* 26, 2233 (2021).
179. Goicoechea-Oses, E. & Ruiz-Aracama, A. Usefulness of the ¹H NMR Multisuppression Approach for the Global Characterization of Monovarietal Extra-Virgin Olive Oils. *Foods* 13, 2298 (2024).
180. Charisiadis, P., Tsiafoulis, C. G., Tzakos, A. G. & Gerothanassis, I. P. Dynamic changes in composition of extracts of natural products as monitored by in situ NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* 52, 764–768 (2014).
181. Diamantakos, P., Velkou, A., Killday, K. B., Gimisis, T., Melliou, E. & Magiatis, P. Oleokoronol and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra-virgin olive oil. *Olivæ* 122, 22–33 (2015).
182. Tsiafoulis, C. G., Liaggou, C., Garoufis, A., Magiatis, P. & Roussis, I. G. Nuclear magnetic resonance analysis of extra virgin olive oil: classification through secoiridoids. *J Sci Food Agric* 104, 1992–2005 (2024).
183. Taft, R. W., & Kamlet, M. J. (1980). Linear solvation energy relationships VIII—solvent effects on NMR spectral shifts and coupling constants. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 14(6), 485–493.
184. He, D. et al. Separation and Purification of Phenolic Acids and Myricetin from Black Currant by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32, 3077–3088 (2009).
185. Owen, R. W. et al. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 41, 703–717 (2003).
186. Li, J., Jiang, H. & Shi, R. A new acylated quercetin glycoside from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Natural Product Research* 23, 1378–1383 (2009).

187. Álvarez-Álvarez, R. et al. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microb Cell Fact* 14, 178 (2015).
188. Lee, J. H. et al. Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chemistry* 136, 843–852 (2013).
189. De Souza, L. A., Tavares, W. M. G., Lopes, A. P. M., Soeiro, M. M. & De Almeida, W. B. Structural analysis of flavonoids in solution through DFT ¹H NMR chemical shift calculations: Epigallocatechin, Kaempferol and Quercetin. *J. Mol. Struct.* 1153, 1–9 (2018).
190. Xu, T., Wang, C., Jiang, S., Yang, T. & Wu, X. Glycosylation of luteolin in hydrophilic organic solvents and structure–antioxidant relationships of luteolin glycosides. *RSC Adv.* 12, 18232–18237 (2022).
191. De Oliveira, D. M., Siqueira, E. P., Nunes, Y. R. F. & Cota, B. B. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 614–620 (2013).
192. Zarycz, M. N. C. & Fonseca Guerra, C. NMR ¹H-Shielding Constants of Hydrogen-Bond Donor Reflect Manifestation of the Pauli Principle. *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 3720–3724 (2018).

8. SAŽETAK

NMR analiza sekoiridoida i flavonoida u ekstraktu lista masline

Marija Varga i Marina Varga

U maslinicama, prilikom rezidbe maslina, stvara se značajna količina fenolima bogatog lišća masline, čiji bioaktivni sastojci, poput sekoiridoida oleuropeina i flavonoida, pokazuju značajan biomedicinski potencijal zahvaljujući izraženom kardioprotektivnom, neuroprotektivnom, antikancerogenom i antimikrobnom učinku. U svrhu određivanja sadržaja pojedinih sekoiridoida u maslinovom ulju, zbog svojih prednosti sve češće se primjenjuje kvantitativna ^1H NMR (q- ^1H NMR) spektroskopija. Međutim, vrlo je rijetko primijenjena na ekstraktu lista masline. U ovom radu ^1H NMR analizom identificiran je oleuropein u ekstraktu lista masline, a dodatno je potvrđen ^{13}C i 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektroskopijom. U svrhu kvantitativne analize, uz primjenu siringaldehida kao internog standarda izrađeni su baždarni pravci u području koncentracije (1) (0,20 - 6,58) i (2) (0,02 - 0,66) mmol/dm³. Za kvantifikaciju je korišten singlet oleuropeina na 5,95 ppm. Kao NMR otapalo odabran je aceton-d₆, koji se kao aprotično otapalo pokazao boljim u odnosu na metanol-d₄ zbog bolje rezolucije ^1H NMR spektra. Evaluirani su validacijski parametri selektivnost, linearnost ($r^2_1=0,9975$, te $r^2_2=0,9691$) i osjetljivost metode (LOD=0,13 mmol/dm³, LOQ=0,40 mmol/dm³). Primjenom qNMR metode određena je prosječna koncentracija oleuropeina u dvama uzorcima lista masline u iznosu od 280 (RSD = 10,6%) te 235 (RSD = 9,4%) mg/g suhog ekstrakta. ^1H NMR analizom utvrđeno je da oleokantal i oleacein nisu prisutni u ekstraktu lista masline, a analiza konstanti sprezanja upućuje da u ekstraktu nema ni drugih najčešćih sekoiridoida prisutnih u maslinovom ulju, oleokoronala, oleomisionala, ligstrodiola oleuropeindiala, elenolida i elenolinske kiseline. Također, ^1H NMR analizom ekstrakata dokazano je prisustvo flavonoida luteolin 7-O-glukozida, luteolina i apigenina, te odsustvo kempferola, naringenina i miricetina. ^1H NMR spektri smjesa standarda flavonoida pokazali su mogućnost pouzdane identifikacije flavonoida bez značajnog preklapanja pikova sličnog kemijskog pomaka. Međutim, utvrđena je ovisnost kemijskog pomaka C-5 OH signala luteolina o mjestu vezanja glukoze na molekuli. Rezultati istraživanja jasno ukazuju na mogućnost primjene ^1H NMR metode u svrhu karakterizacije sastava sekoiridoida i flavonoida u ekstraktu lista masline te kvantitativne analize oleuropeina u listu masline.

ključne riječi: list masline, qNMR, oleuropein, oleokantal, flavonoidi

9. SUMMARY

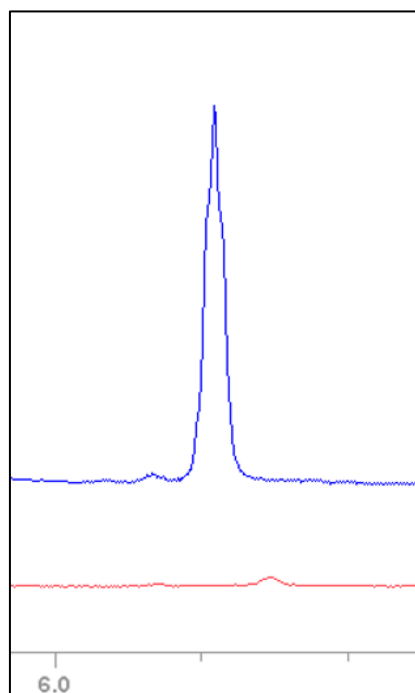
NMR analysis of secoiridoids and flavonoids in olive leaf extract

Marija Varga i Marina Varga

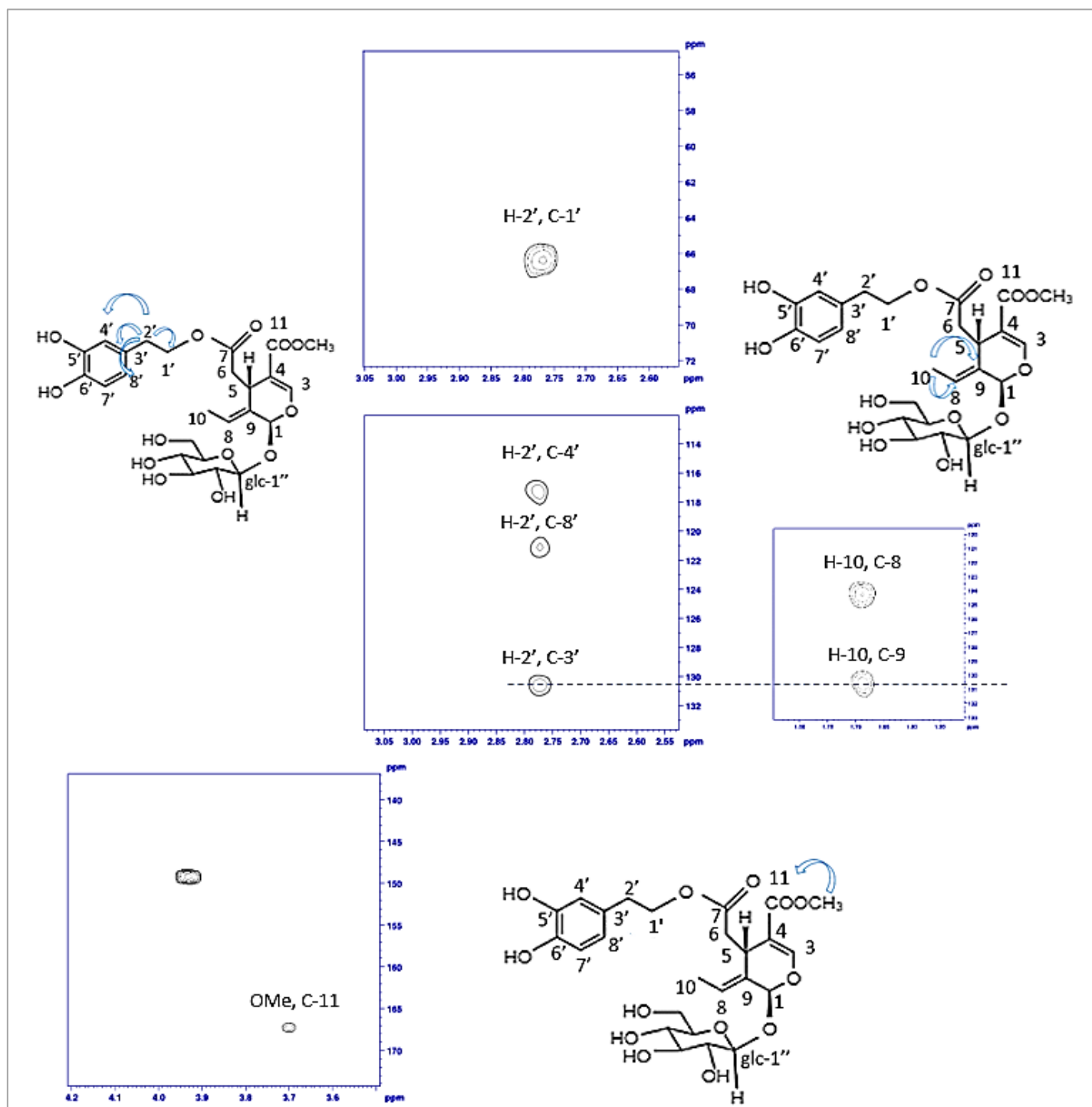
In olive groves, during olive pruning, a significant amount of phenol-rich olive leaves is produced, whose bioactive components, such as the secoiridoid oleuropein and flavonoids, show significant biomedical potential due to their pronounced cardioprotective, neuroprotective, anticarcinogenic and antimicrobial effects. For the purpose of determining the content of individual secoiridoids in olive oil, quantitative ^1H NMR ($q\text{-}^1\text{H}$ NMR) spectroscopy is increasingly being used due to its advantages. However, it has been very rarely applied to olive leaf extract. In this work, oleuropein was identified in olive leaf extract by ^1H NMR analysis, and was additionally confirmed by ^{13}C and 2D $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMBC spectroscopy. For the purpose of quantitative analysis, calibration curves were prepared in the concentration range (1) (0.20 - 6.58) and (2) (0.02 - 0.66) mmol/dm^3 , using syringaldehyde as an internal standard. For quantification, the oleuropein singlet at 5.95 ppm was used. Acetone- d_6 was chosen as the NMR solvent, which proved to be better as an aprotic solvent than methanol- d_4 due to better resolution of the ^1H NMR spectrum. The validation parameters selectivity, linearity ($r^2_1=0.9975$, and $r^2_2=0.9691$) and sensitivity of the method ($\text{LOD}=0.13 \text{ mmol/dm}^3$, $\text{LOQ}=0.40 \text{ mmol/dm}^3$) were evaluated. The qNMR method was used to determine the average concentration of oleuropein in two olive leaf samples in the amount of 280 (RSD = 10.6%) and 235 (RSD = 9.4%) mg/g of dry extract. ^1H NMR analysis revealed that oleocanthal and oleacein are not present in the olive leaf extract, and analysis of the coupling constants indicates that the extract also does not contain the other most common secoiridoids present in olive oil, oleokoronal, oleomissional, ligstrodiol, oleuropeindiol, elenolide and elenolic acid. Also, ^1H NMR analysis of extracts proved the presence of flavonoids luteolin 7-O-glucoside, luteolin and apigenin, and the absence of kaempferol, naringenin and myricetin. ^1H NMR spectra of mixtures of flavonoid standards showed the possibility of reliable identification of flavonoids without significant overlap of peaks with similar chemical shifts. However, the dependence of the chemical shift of the C-5 OH signal of luteolin on the glucose binding site on the molecule was determined. The research results clearly indicate the possibility of applying the ^1H NMR method for the purpose of characterizing the composition of secoiridoids and flavonoids in olive leaf extract and the quantitative analysis of oleuropein in olive leaf.

keywords: olive leaf, qNMR, oleuropein, oleocanthal, flavonoids

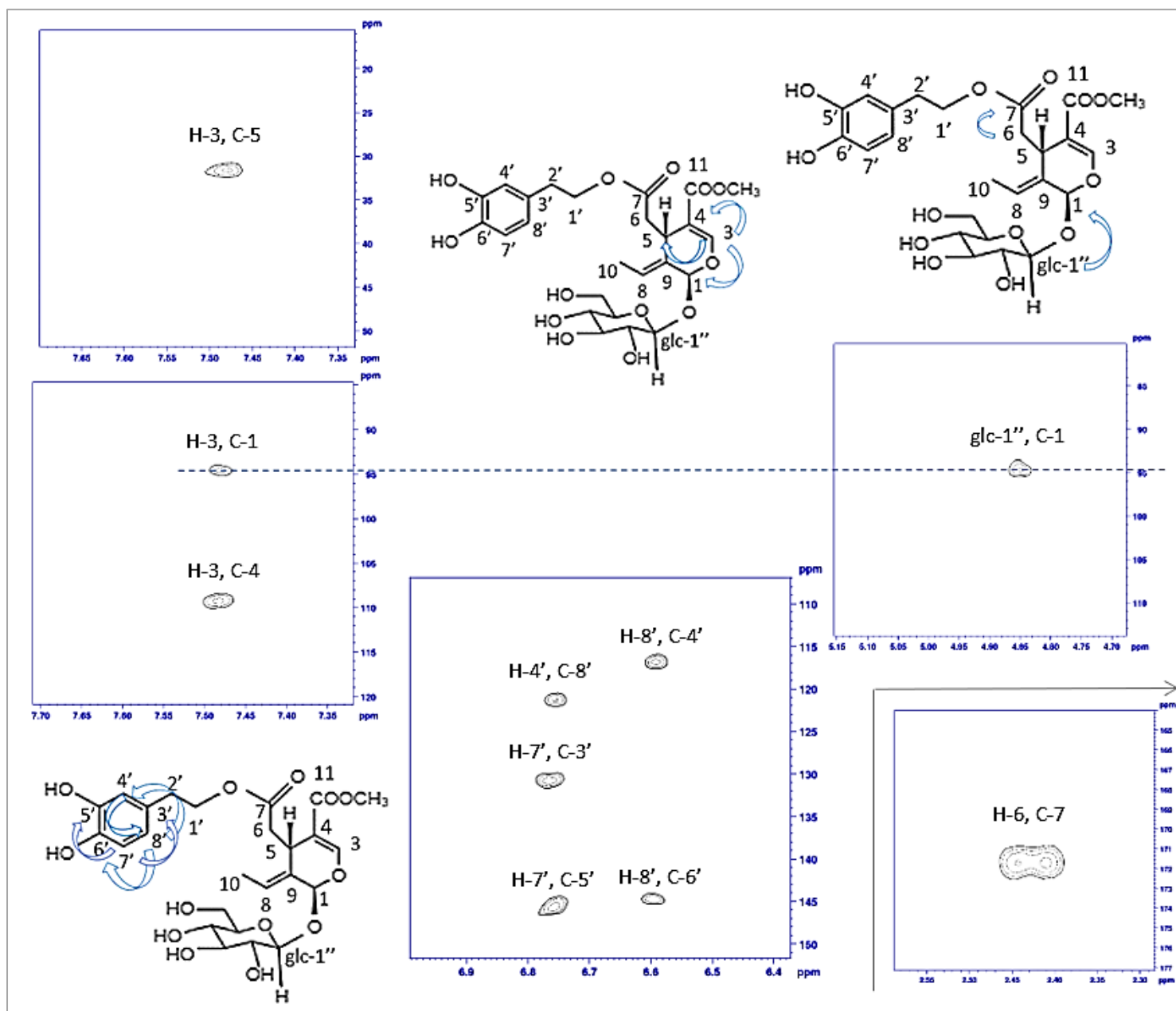
10. PRILOZI



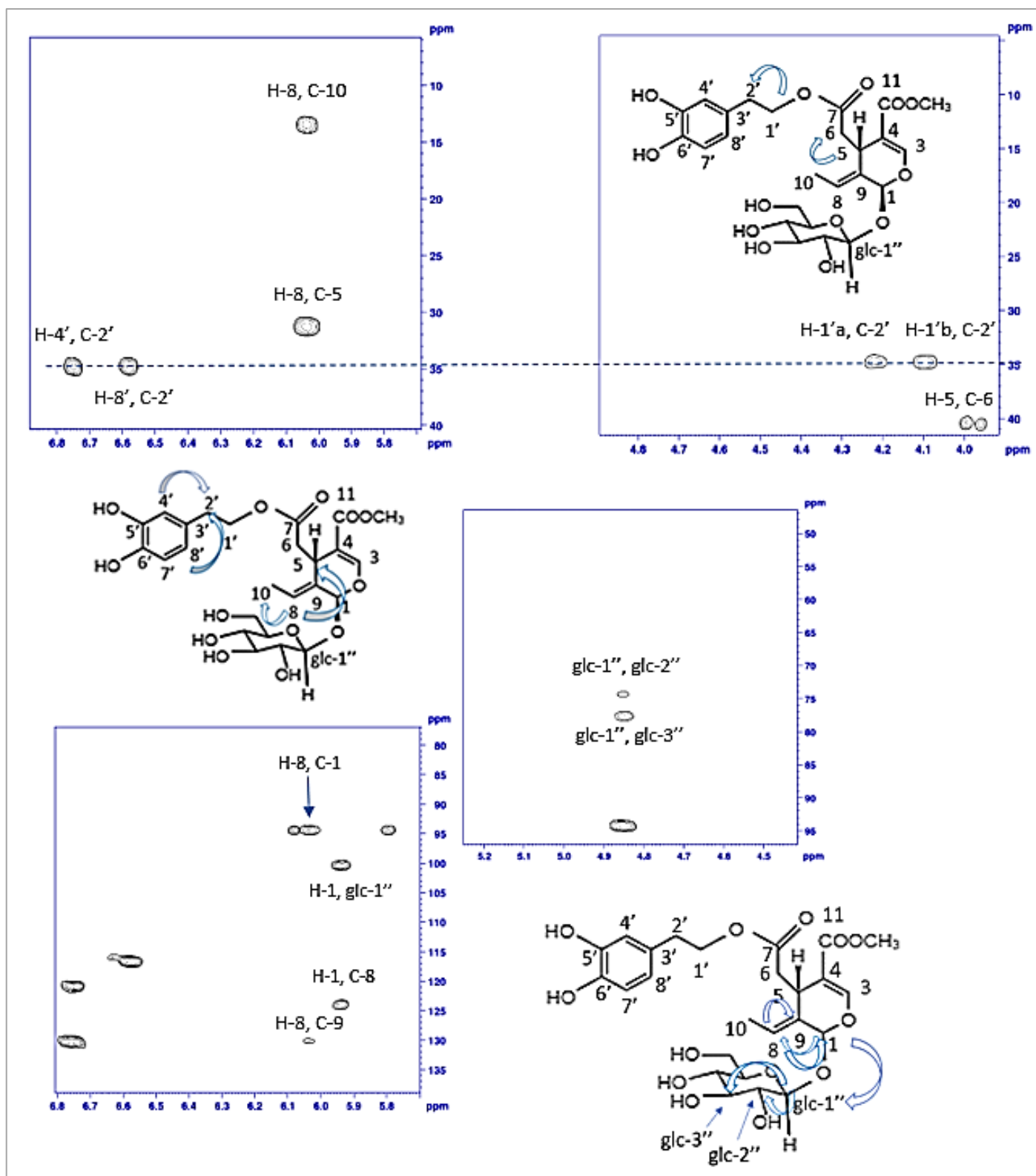
Prilog 1. Provjera kvantitativnosti analitičke metode određivanja sadržaja oleuropeina u ekstraktu lista masline. Pik oleuropeina na $\sim 5,9$ ppm u ^1H NMR spektru „NMR uzorka 1“ u acetonu- d_6 (plavo) i „NMR uzorka 2“ u metanolu- d_4 (crveno).



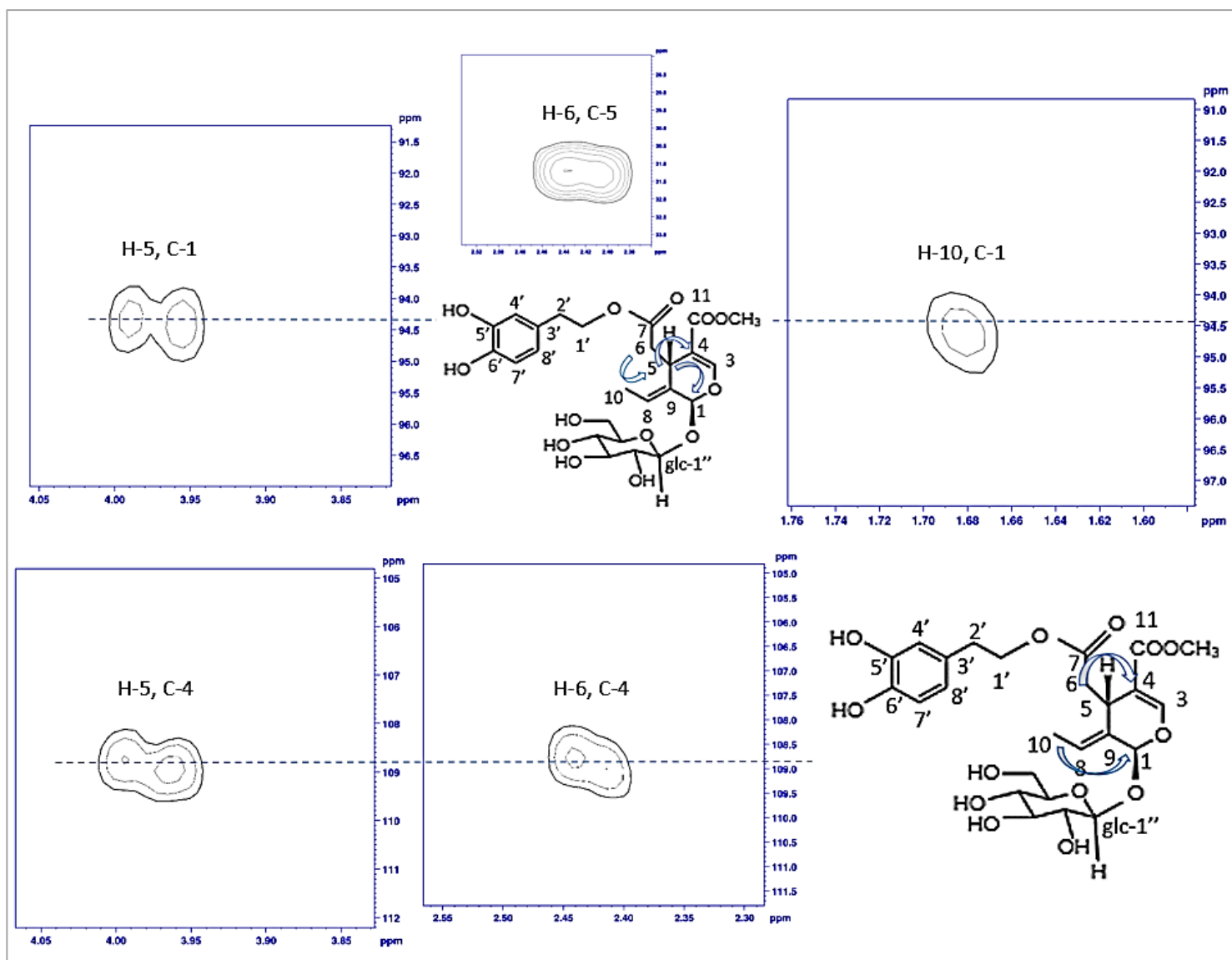
Prilog 2. Detektirane korelacije oleuropeina u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $1,45 \text{ mmol/dm}^3$.



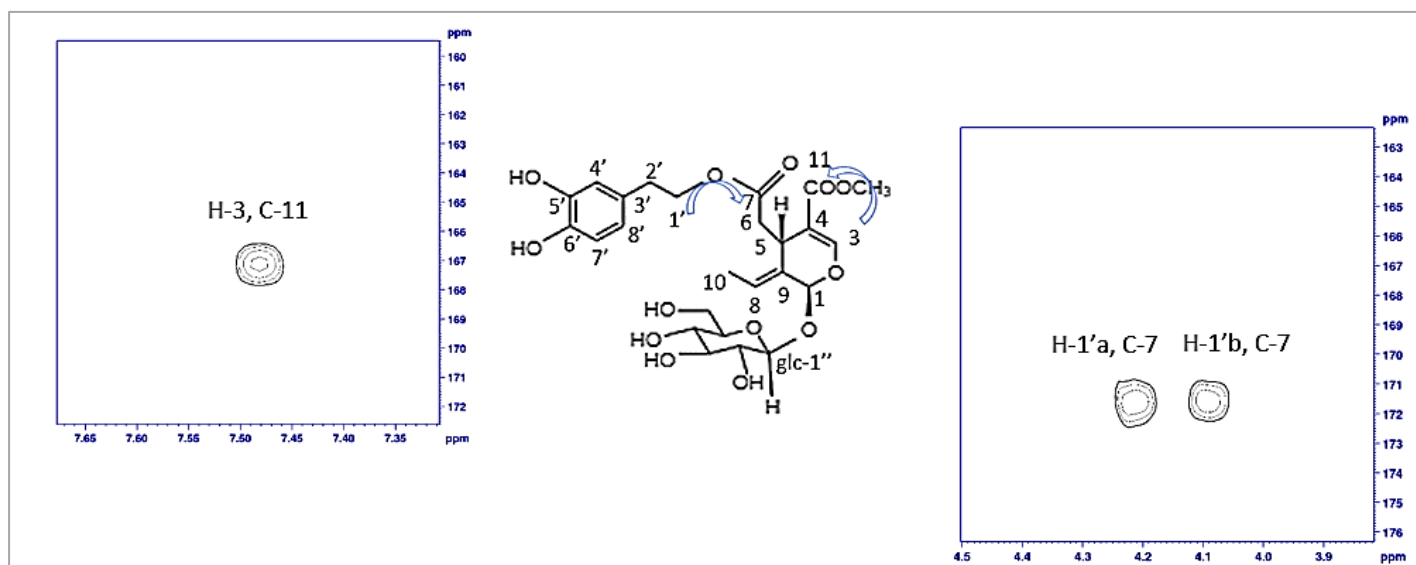
Prilog 3. Detektirane korelacije oleuropeina u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$ (koje nisu bile prisutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $1,45 \text{ mmol/dm}^3$).



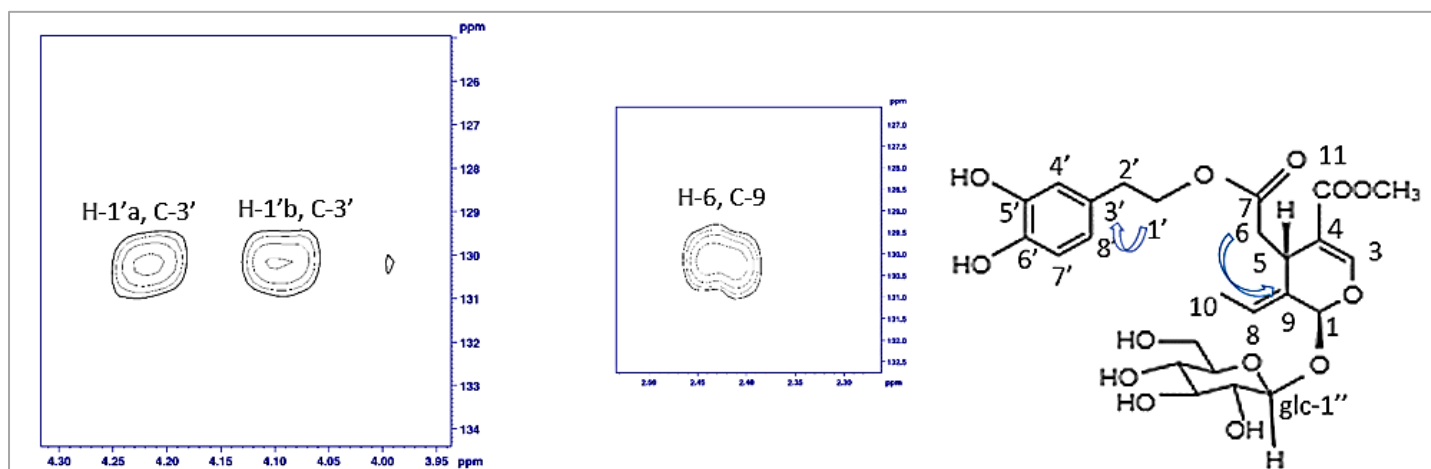
Prilog 4. Detektirane korelacije oleuropeina u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 (koje nisu bile prisutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$) – 1.dio.



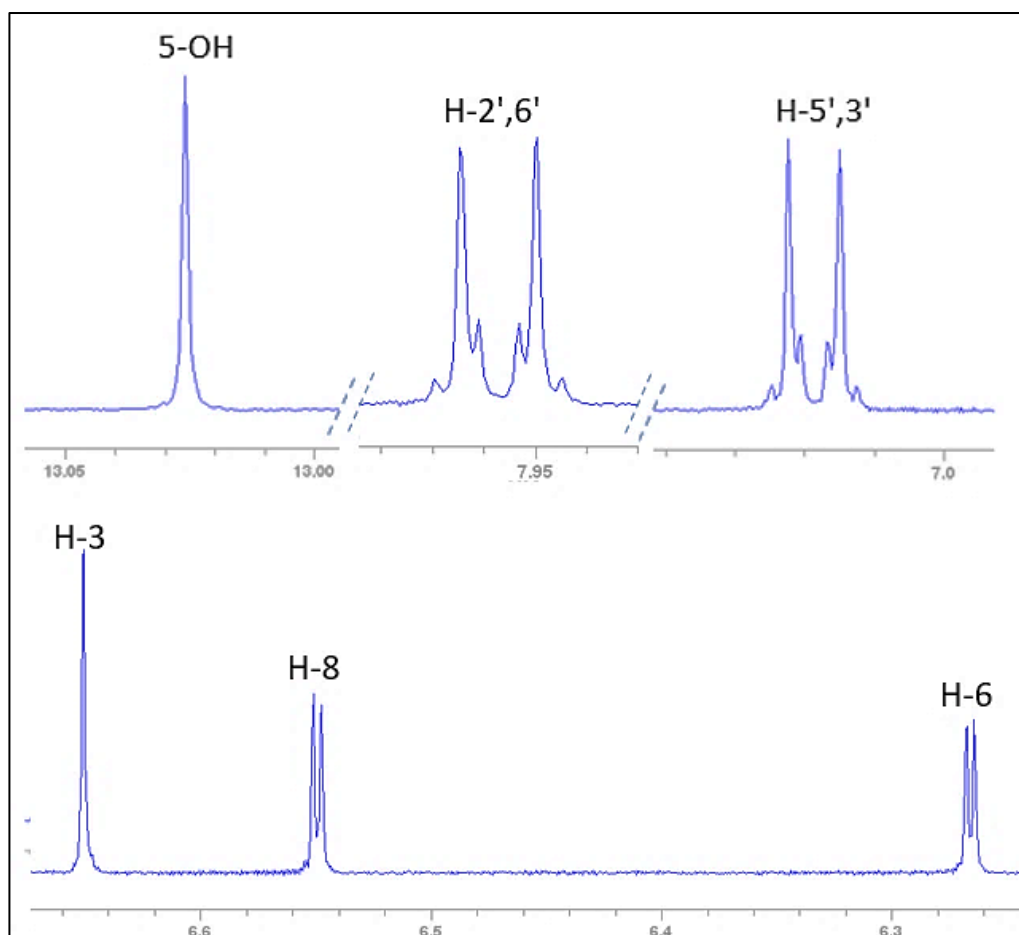
Prilog 5. Detektirane korelacije oleuropeina u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 (koje nisu bile prisutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$) – 2.dio.



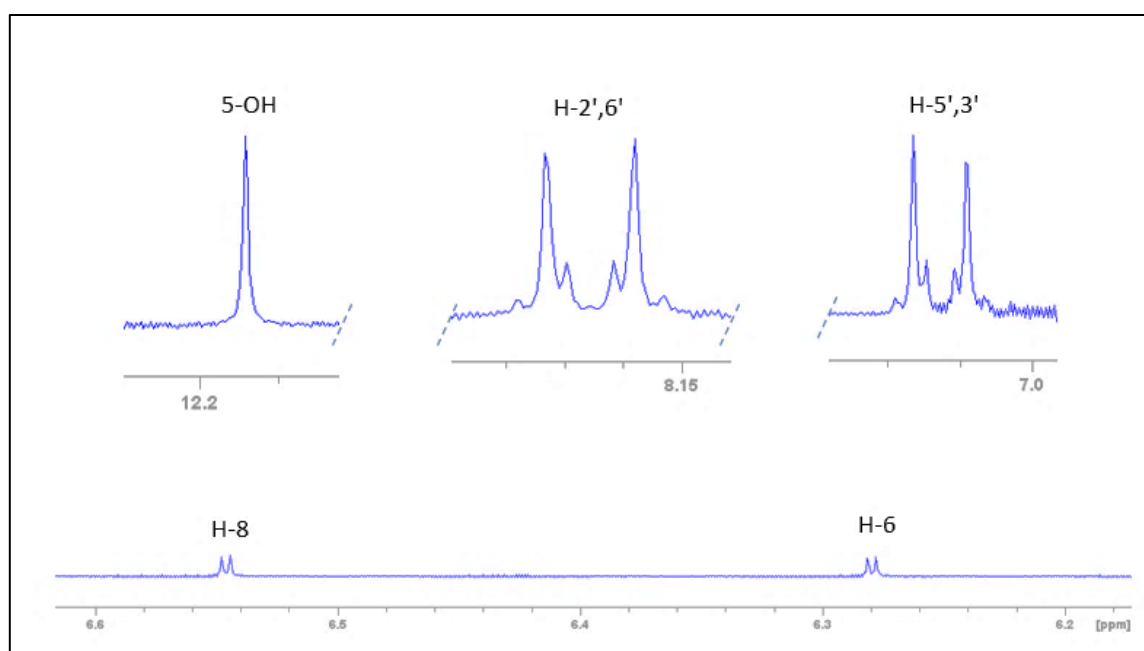
Prilog 6. Detektirane korelacije oleuropeina u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 (koje nisu bile prisutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$) – 3.dio.



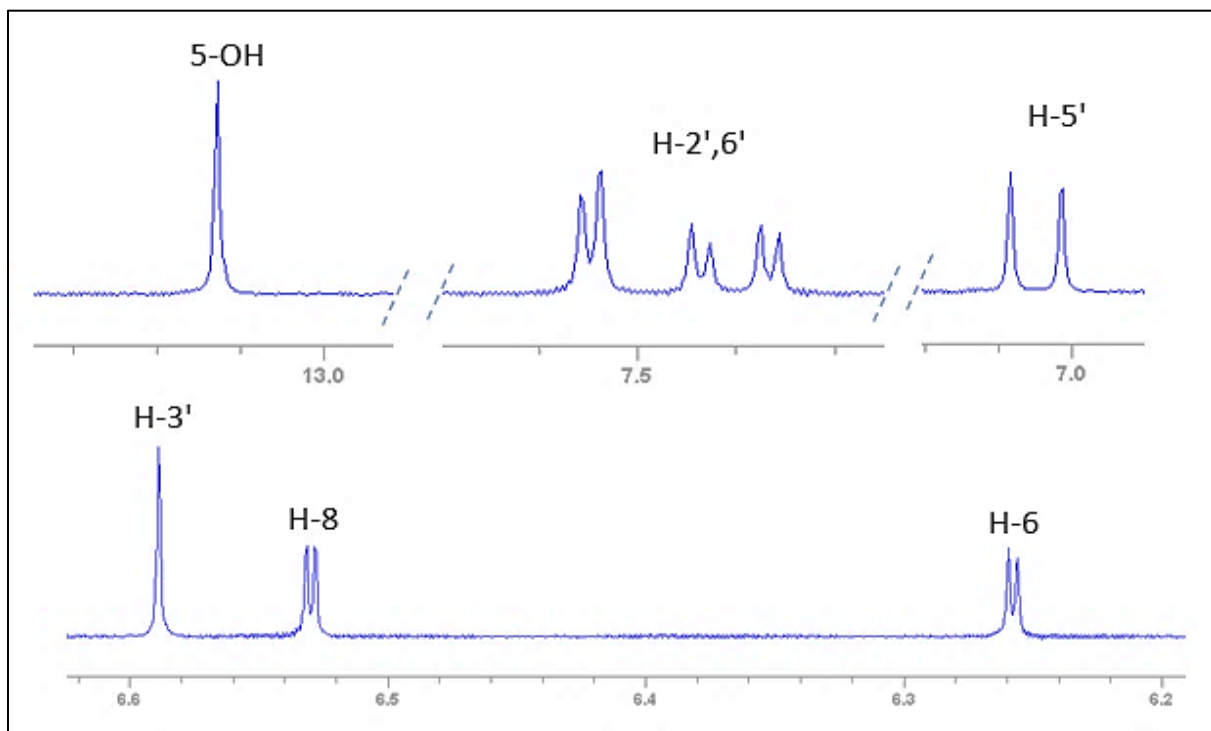
Prilog 7. Detektirane korelacije oleuropeina u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru ekstrakta lista masline u acetonu- d_6 (koje nisu bile prisutne u 2D ^1H - ^{13}C HMBC spektru otopine standarda oleuropeina u acetonu- d_6 koncentracije $3,68 \text{ mmol/dm}^3$) – 4.dio.



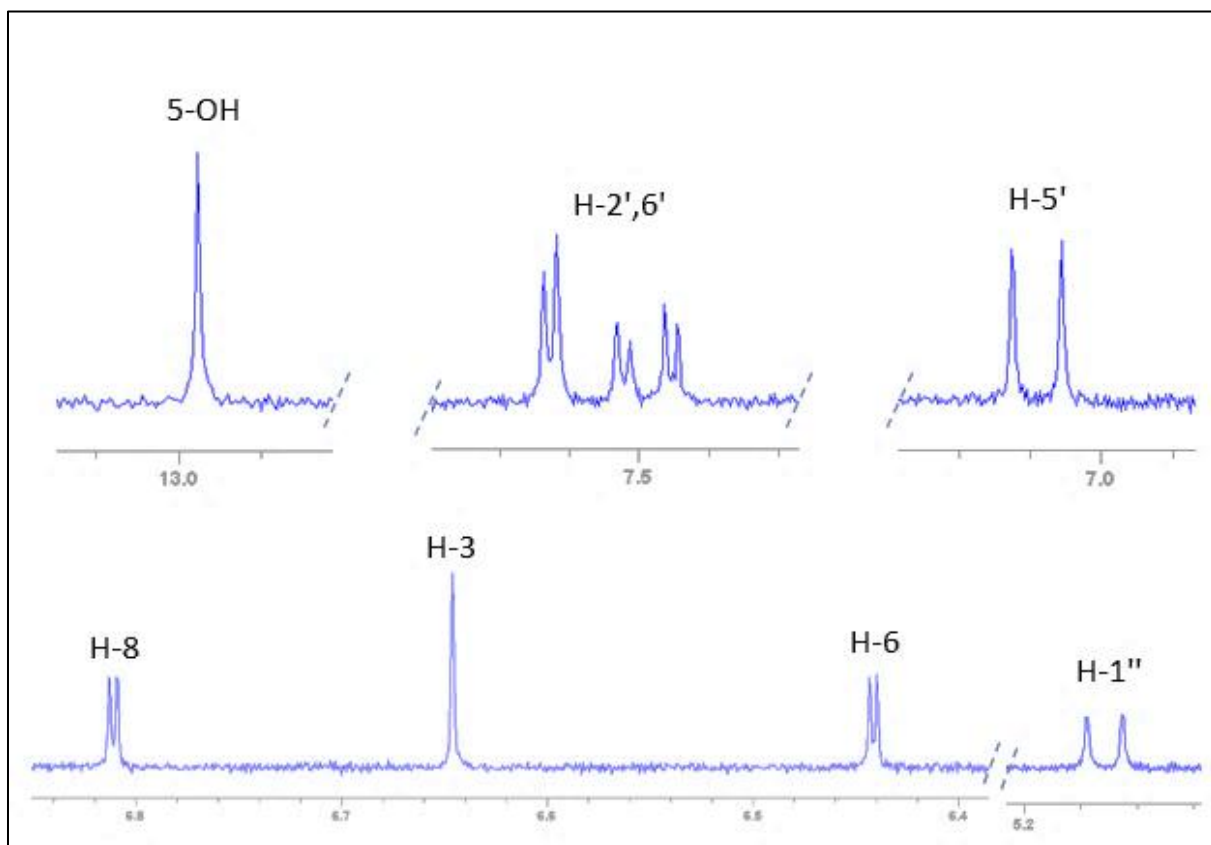
Prilog 8. ^1H NMR spektar otopine standarda apigenina u acetonu- d_6 .



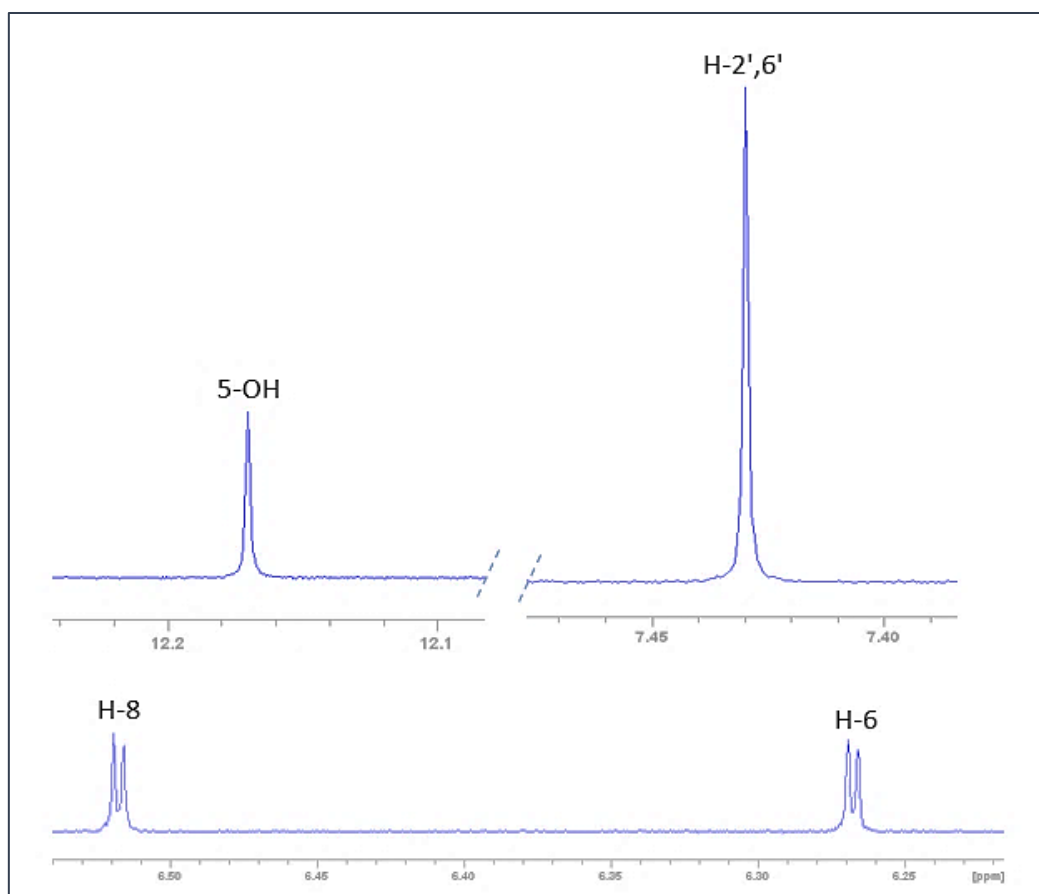
Prilog 9. ^1H NMR spektar otopine standarda kempferola u acetonu- d_6 .



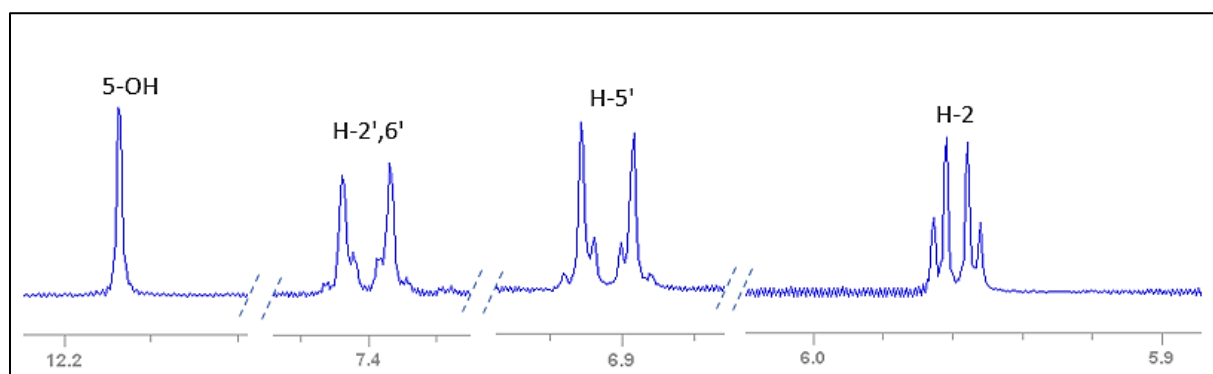
Prilog 10. ^1H NMR spektar otopine standarda luteolina u acetonu- d_6 .



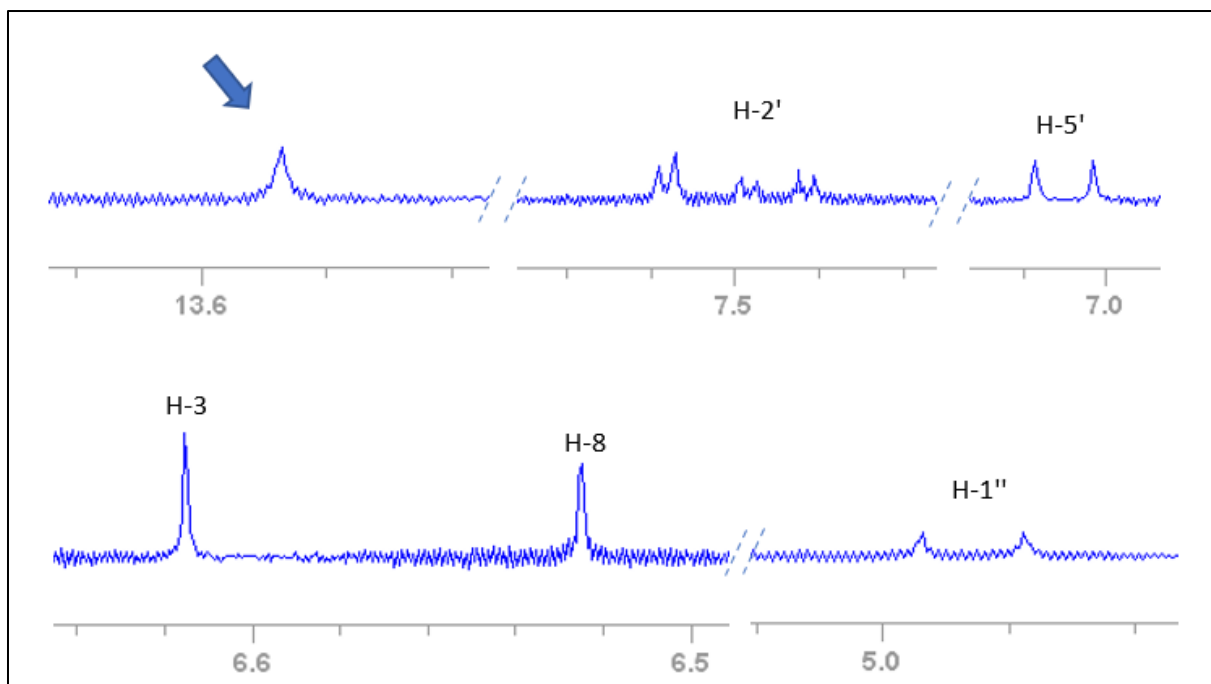
Prilog 11. ^1H NMR spektar otopine standarda luteolin 7-O-glukozida u acetonu- d_6 .



Prilog 12. ^1H NMR spektar otopine standarda miricetina u acetonu- d_6 .



Prilog 13. ^1H NMR spektar otopine standarda naringenina u acetonu- d_6 .



Slika 14. ^1H NMR spektar otopine standarda luteolin 6-C-glukozida u acetonu- d_6 . Strelicom označen pik na 13,59 ppm.