Razvoj i validacija HPLC metode za karakterizaciju bioaktivnog sastava biljnih sirovina

Vučilovski, Jasmina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:057003

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 23. rujan 2016.

Jasmina Vučilovski

660/PI

RAZVOJ I VALIDACIJA HPLC METODE ZA KARAKTERIZACIJU BIOAKTIVNOG SASTAVA BILJNIH SIROVINA

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te u Laboratoriju za mjerenje i automatizaciju, Zavoda za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao dio istraživanja u sklopu znanstvenog projekta financiranog od strane europskog socijalnog fonda, programa Unaprijeđenje ljudskih potencijala pod nazivom"*Praćenje antioksidacijske aktivnosti samoniklog bilja primjenom mikroreaktora (MICRO-AA)*", pod mentorstvom dr.sc. Draženke Komes, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc.dr.sc. Ane Belščak-Cvitanović.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof.dr.sc Draženki Komes, na stručnom vodstvu pri izvedbi diplomskog rada. Također se zahvaljujem doc.dr.sc. Ani Belščak-Cvitanović na pomoći pri pisanju i izvedbi eksperimentalnog dijela te na brojnim savjetima i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom svih godina studiranja, majci Nevenki, ocu Franji i sestri Ljiljani. Veliko vam hvala na svemu što ste mi pružili tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ I VALIDACIJA HPLC METODE ZA KARAKTERIZACIJU BIOAKTIVNOG SASTAVA BILJNIH SIROVINA

Jasmina Vučilovski, 660/PI

Sažetak: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) danas predstavlja nezaobilazan korak u analizi bioaktivnog sastava biljnih supstrata. Međutim, postoji potreba za razvojem jedinstvene i univerzalne metode koja bi omogućila, brzu, rutinsku i pouzdanu analizu velikog broja strukturno različitih bioaktivnih spojeva, iz botanički raznovrsnih uzoraka, kao što su ekstrakti ljekovitih biljnih vrsta. Stoga je cilj ovog rada bio razviti jedinstvenu HPLC-DAD metodu za određivanje polifenolnih spojeva u određenim ljekovitim biljnim vrstama. Osim razvoja i validacije HPLC-DAD metode provedena je spektrofotometrijska analiza polifenolnog sastava vodenih ekstrakata šesnaest biljnih vrsta. Najveći udjel ukupnih polifenola, hidroksicimetnih kiselina, flavona i flavonoida te najveći antioksidacijski kapacitet određeni su u ekstraktima biljnih vrsta iz porodice *Lamiaceae* (paprena metvica, matičnjak). Vrijednosti granice detekcije i kvantifikacije te visoka vrijednost točnosti i preciznosti pokazuju prikladnost razvijene HPLC metode za kvantifikaciju polifenolnih spojeva u ispitivanim biljnim vrstama. Novorazvijenom HPLC metodom u ispitivanim biljnim vrstama određeno je ukupno 24 spoja koji pripadaju hidroksibenzojevim i hidroksicimetnim kiselinama te flavonoidima. Primjenom razvijene metode, određen je karakterističan visok udjel ružmarinske kiseline te luteolina u biljkama iz porodice *Lamiaceae*, te pojedinačni polifenolni spojevi identificirani u samo jednoj biljnoj vrsti što se može smatrati njihovim svojevrsnim taksonomskim biomarkerima.

Ključne riječi: biljni ekstrakti, HPLC-DAD metoda, validacija, hidroksicimetne kiseline, flavonoidi
Rad sadrži: 65 stranica, 8 slika, 8 tablica, 60 literaturnih navoda,
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: Prof.dr.sc. Draženka Komes
Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo
2. Prof.dr.sc. Draženka Komes
3. Doc.dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković

Datum obrane: 23. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology
Laboratory for Carbohydrate and confectionery products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC METHOD FOR THE BIOACTIVE COMPOSITION CHARACTERIZATION OF PLANT MATERIALS

Jasmina Vučilovski, 660/PI

Abstract: Nowadays, high performance liquid chromatography (HPLC) represents an unavoidable step in the analysis of bioactive composition of plant substrates. However, there is a need for the development of a unique and universal method which would enable rapid, reliable and routine analysis of a large number of structurally diverse bioactive compounds from botanically different samples, such as medicinal plant extracts. Therefore, the aim of this study was to develop a unique HPLC-DAD method for determination of polyphenolic compounds in certain medicinal plants. In addition to the development and validation of HPLC-DAD method, spectrophotometric analysis of polyphenolic compound from aqueous extracts of sixteen medicinal plant species was carried out. The highest content of total polyphenols, hydroxycinnamic acids, flavones and flavonoids and the most potent antioxidant capacity were determined in extracts of the *Lamiaceae* plants (peppermint, lemon balm). The values of the limit of detection and quantification and high values determined for the accuracy and precision show the suitability of the developed HPLC method for the quantification of polyphenolic compounds in the evaluated plant species. The newly developed HPLC method in the studied plant species enabled the separation and determination of 24 polyphenolic compounds belonging to the hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and flavonoids. By employing the developed method, high contents of rosmarinic acid and luteolin, characteristic for the plants of *Lamiaceae* family were determined, as well as individual polyphenolic compounds identified in only one plant species, which can be considered as a kind of their taxonomic biomarkers.

Keywords: herbal extract, HPLC-DAD method, validation, hydroxycinnamic acids, flavonoids
Thesis contains: 65 pages, 8 figures, 8 tables, 60 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: PhD. Draženka Komes, Full professor
Technical support and assistance: PhD. Ana Belščak-Cvitanović, Assistant professor

Reviewers:
1. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor
2. PhD. Draženka Komes, Full professor
3. PhD. Ana Belščak-Cvitanović, Assistant professor
4. PhD. Ksenija Marković, Associate professor

Thesis defended: 23 September 2016

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. KONTROLA KVALITETE LJEKOVITOG BILJA 3

2.1.1. Određivanje stranih primjesa 3

2.1.2. Makroskopski i mikroskopski pregled 3

2.1.3. Kromatografska ispitivanja 4

2.1.4. Određivanje pepela 4

2.1.5. Određivanje vode i hlapivih tvari 5

2.1.6. Određivanje ostataka pesticida 5

2.2. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNE KVALITETE LJEKOVITIH BILJNIH VRSTA 6

2.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) 7

2.3.1. Podjela HPLC metoda 9

2.4. VALIDACIJA METODE 9

2.4.1. Specifičnost/ selektivnost 11

2.4.2. Linearnost i radno područje 11

2.4.3. Preciznost 12

2.4.4. Točnost 13

2.4.5. Granica detekcije/kvantifikacije 13

2.4.6. Robusnost 13

2.5. PRIMJENA HPLC-a 13

3. EKSPERIMENTALNI DIO 16

3.1. MATERIJALI 16

3.1.1. Uzorci 16

3.1.2. Priprema biljnih ekstrakata 16

3.1.3. Kemikalije 18

3.1.4. Aparatura i pribor 20

3.2. METODE RADA 21

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola 21

3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina 22

3.2.3. Određivanje udjela flavona i flavonola 23

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta-ABTS metoda 24
3.2.5. Određivanje udjela polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) 26
3.2.6. Parametri validacije 29
4. REZULTATI I RASPRAVA 31
4.1. PRELIMINARNA ANALIZA UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA U BILJNIM EKSTRAKTIMA 32
4.2. RAZVOJ UNIVERZALNE HPLC METODE ZA ANALIZU POLIFENOLNIH SPOJEVA U BILJNIM EKSTRAKTIMA 42
4.3. VALIDACIJA NOVORAZVIJENE HPLC METODE 45
4.4. KVANTITATIVNI SASTAV ISPITIVANIH BILJNIH EKSTRAKATA ODREĐEN PRIMJENOM NOVORAZVIJENE HPLC METODE 50
5. ZAKLJUČCI 58
6. LITERATURA 60

1. UVOD

Zahvaljujući sve većem broju znanstvenih istraživanja koja su potvrdila pozitivni utjecaj različitih ljekovitih biljaka na zdravlje u posljednja dva desetljeća, te opravdala njihovu uporabu u tradicionalnim medicinskim sustavima, njihovo korištenje i potrošnja kontinuirano rastu (Tapsell i sur., 2006). Poseban interes za ljekovite biljne vrste pokazuju prehrambena i farmaceutska industrija, što je posljedica korištenja ljekovitih biljnih vrsta i začina kao izvora bioaktivnih funkcionalnih sastojaka, namijenjenih njihovoj daljnjoj implementaciji u proizvode s dodanom vrijednošću. U tu je svrhu neophodno identificirati točne aktivne sastojke biljnih supstrata koji imaju pozitivna bioaktivna svojstva. Danas farmaceutska, kozmetička te prehrambena industrija, već imaju razvijene vlastite stroge sustave kontrole kvalitete, međutim još uvijek ne postoji jedinstveni sustav koji bi omogućio jednoliku i detaljnu karakterizaciju specifičnih bioaktivnih sastojaka. Trenutno se definicija kvalitete ljekovitih biljnih pripravaka temelji na: i) autentifikaciji polaznog biljnog materijala pomoću klasične taksonomije, ii) bioaktivnom profilu biljnih ekstrakata/pripravaka pomoću kromatografskih tehnika i iii) kvantitativnom određivanju jednog ili nekoliko fitokemijskih markera i njihovog omjera (Nutraingredients, 2012). Većina zemalja razvila je vlastite propise za kvalitetu biljnih lijekova namijenjenih za unutarnje tržište ili izvoz, ali zahtjevi kvalitete različitih nacionalnih farmakopeja variraju između zemalja. Stoga je potreban jedinstven i pouzdan skup analitičkih metoda kako bi se dobili točni i dostatni rezultati o fitokemijskom sastavu ispitivanih biljnih supstrata.

Općenito se za procjenu kvalitete i autentičnosti jedne biljke ili biljnog pripravka koristi samo jedan ili dva markera farmakološki aktivnih spojeva. No, takvi podaci ne omogućuju uvid u detaljan bioaktivni sastav biljnih proizvoda, u kojima često više sastojaka djeluje sinergistički te je upravo taj sinergistički efekt odgovoran za terapeutske učinke samog proizvoda. Kako bi se dobili točni bioaktivni profili biljnih pripravaka moraju se primijeniti različite analitičke tehnike (Liang i sur., 2004). Međutim, brojne napredne tehnike, opisane u literaturi, koje se koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu bioaktivnih spojeva nisu uvijek pogodne za primjenu u drugim laboratorijima. Osim toga, većina analitičkih tehnika zahtjeva dugotrajnu i kompliciranu pripremu uzorka te dug proces analitičkog postupka što rezultira manjim brojem laboratorija koji mogu provoditi te analitičke tehnike. Kromatografija je jedna od najčešće korištenih tehnika zbog

velike učinkovitosti izdvajanja različitih spojeva prisutnih u ispitivanom ekstraktu ili supstratu (Escarpa i sur., 2001; Tsao i Yang, 2003).

Određivanje polifenolnih spojeva, jedne od visoko vrijednih skupina bioaktivnih spojeva, može se smatrati primarnim korakom u procjeni farmakološkog djelovanja ljekovitih biljnih vrsta (Rodriguez i sur., 2012). Iako postoji više različitih pristupa za analizu polifenolnih spojeva, postupak njihovog izdvajanja i kvantifikacije je i dalje analitički vrlo zahtjevan. U svrhu izdvajanja i kvantifikacije polifenolnih spojeva objavljen je velik broj znanstvenih istraživanja o razvoju HPLC-DAD metoda koje se primjenjuju za analizu polifenolnih spojeva prisutnih u ljekovitim biljkama. Obično ove metode omogućuju izdvajanje pojedinih podskupina polifenolnih spojeva, najčešće fenolnih kiselina (Li i sur., 2011; Olkowski i sur., 2003; Parejo i sur., 2004; Liaudanskas i sur., 2014; Vagiri i sur., 2012) dobivenih iz ograničenog broja biljnih supstrata. Osim toga, pretraživanje znanstvenih radova o polifenolnim spojevima prisutnim u različitim biljnim vrstama je vrlo zahtjevno jer pojedini znanstveni radovi najčešće predstavljaju profil samo jedne ili nekoliko botanički povezanih biljnih vrsta. Iz tog razloga postoji potreba za sistematizacijom podataka o polifenolnim spojevima većeg broja ljekovitog bilja, te formiranje svojevrsne baze podataka o bioaktivnoj kvaliteti velikog broja biljnih vrsta u jednom radu.

Cilj ovog rada je razviti jedinstvenu HPLC-DAD metodu za određivanje polifenolnih spojeva u određenim ljekovitim biljnim vrstama. Osim razvoja i validacije HPLC-DAD metode provest će se spektrofotometrijska analiza vodenih ekstrakata šesnaest biljnih vrsta. Spektrofotometrijskom analizom biljnih ekstrakata odredit će se udjel ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavona i flavonoida, kao i antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata primjenom ABTS metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONTROLA KVALITETE LJEKOVITOG BILJA

Upotreba ljekovitog bilja poznata je još od davnina kada su se pojedini biljni materijali (korijen, list i cvijet) koristili za izradu čajeva u domaćinstvima. Danas ljekovito bilje ima daleko širu primjenu pa je stoga potrebno provesti ispitivanje kvalitete ljekovitih biljaka kako bi se utvrdio njihov identitet, čistoća i kakvoća. Propise o ispitivanju kvalitete ljekovitih biljaka donose farmakopeje i međunarodni standardi. Odgovaraju li biljke tim propisima mogu naći terapijsku primjenu i poslužiti kao sirovina za izradu ljekovitih pripravaka (Kuštrak, 2005). Stoga je nužno uspostaviti međunarodno priznate smjernice za procjenu kvalitete biljnog materijala, u čemu uvelike pomažu smjernice Svjetske zdravstvene organizacije koja je izdala priručnik „*Metode kontrole kvalitete ljekovitog biljnog materijala*“ iz kojeg su preuzete metode koje slijede, a kojima ljekovito bilje mora udovoljavati (WHO, 1998).

2.1.1. Određivanje stranih primjesa

Biljni materijali ne smiju sadržavati vidljive znakove kontaminacije: plijesni, insekte, životinjska onečišćenja uključujući životinjske izlučevine. Pojava nekarakterističnog mirisa, promjena boje ili sluzi treba biti pravovremeno otkrivena. Tijekom skladištenja, proizvode treba držati na higijenski čistom mjestu, kako bi se izbjegla kontaminacija, posebice stvaranje plijesni koje proizvode aflatoksine. Makroskopski pregled dovoljan je za utvrđivanje prisutnosti stranih tvari u cijelom ili izrezanom biljnom materijalu dok je za praškaste materijale potreban mikroskopski pregled. Zemlja, kamenje, pijesak, prašina i druge strane anorganske tvari moraju biti uklonjene prije usitnjavanja ili testiranja biljnog materijala.

2.1.2. Makroskopski i mikroskopski pregled

Ljekoviti biljni materijal kategorizira se prema senzorskim, makroskopskim i mikroskopskim obilježjima. Pregled tih karakteristika je prvi korak prema identifikaciji i određivanju stupnja čistoće materijala te se treba provesti prije bilo kakvih daljnjih testova.

Vizualni pregled puža najjednostavniji i najbrži način utvrđivanja identiteta, čistoće te približno i kvalitete. U slučaju da se uzorak znatno razlikuje, u smislu boje, konzistencije, mirisa ili okusa u odnosu na specifikacije, smatra se da ne ispunjava uvjete.

Makroskopski identitet ljekovitog bilja temelji se na obliku, boji, veličini, svojstvima površine, teksturi, svojstvima loma i izgledu površine reza. Provodi se prostim okom ili pomoću povećala te se provjerava da li morfološko obilježje odgovara propisu Farmakopeje.

Mikroskopski pregled biljnog materijala neophodan je za identifikaciju usitnjenog materijala ili praškastog materijala (uzorak može biti tretiran kemijskim reagensima).

Makroskopski i mikroskopski pregled ne mora uvijek pružiti kompletnu identifikaciju, stoga ga je potrebno koristiti i s ostalim analitičkim analizama.

2.1.3. Kromatografska ispitivanja

Kromatografske metode mogu se primjenjivati za kvalitativnu i kvantitativnu analizu pojedinih sastojaka. Za identifikaciju sastojaka u biljnom materijalu ili ljekovitim pripravcima, Farmakopeje najčešće primjenjuju tankoslojnu kromatografiju koja je prikladna za kvalitativno određivanje malih udjela nečistoća. Tom se metodom dokazuje jedna određena komponenta ili njih nekoliko (određena skupina tvari). Za analizu pojedinih sastojaka prisutnih u biljnom materijalu ili ljekovitom pripravku koriste se još kromatografija u stupcu, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i plinska kromatografija. Plinska kromatografija prikladna je za analizu eteričnih ulja i za identifikaciju pojedinih sastojaka.

2.1.4. Određivanje pepela

Pepeo, koji preostaje nakon spaljivanja ljekovitog biljnog materijala, određuje se pomoću tri različite metode kojima se mjeri ukupni pepeo, pepeo netopiv u kiselini i pepeo topiv u vodi.

Ukupni pepeo predstavlja ukupan iznos materijala preostalog nakon paljenja te uključuje „fiziološki“ pepeo, koji se dobije iz samog biljnog tkiva i „ne-fiziološki“ pepeo, koji predstavlja ostatak stranih tvari (npr. pijeska i tla) koje su se zadržale na površini biljke.

Pepeo netopiv u kiselini predstavlja ostatak dobiven nakon ključanja ukupnog pepela sa razrijeđenom klorovodičnom kiselinom i paljenjem preostale mase između ukupnog pepela i ostatka nakon tretmana ukupnog pepela s vodom.

2.1.5. Određivanje vode i hlapivih tvari

Višak vode u ljekovitom biljnom materijalu može potaknuti rast mikroorganizama, uzrokovati prisustvo gljivica ili insekata te će utjecati na pogoršanje hidrolize. Granice za udio moraju biti definirane za svaki biljni materijal, a to je osobito važno za materijale koji lako upijaju vlagu.

Azeotropska metoda izravnim mjerenjem daje udio vode prisutne u materijalu koji se ispituje. Test za gubitak sušenjem određuje oboje, vodu i hlapljive tvari. Sušenje se može provoditi zagrijavanjem na 100-105°C ili u eksikatoru ili smanjenjem pritiska na sobnoj temperaturi kroz određeno vremensko razdoblje. Metoda isušivanja je posebno korisna za materijale koji se tope u ljepljivu masu na povišenim temperaturama.

2.1.6. Određivanje ostataka pesticida

Ljekoviti biljni materijali mogu sadržavati ostatke pesticida koji se akumuliraju tijekom prskanja, tretmana tla raznim sredstvima tijekom kultiviranja i korištenjem fumiganata tijekom skladištenja. Stoga se u svakoj zemlji preporučuje bar jedna laboratorijska kontrola za određivanje pesticida u ljekovitim biljnim vrstama (prirodno uzgojenim ili kultiviranim). Preporučuju se granice koje su postavile Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO).

Uz dulju izloženost pesticidima preporučuje se ispitivanje ljekovitog bilja na prisutnost organski vezanog klora i fosfora, odnosno treba odrediti udio tih dviju tvari. Kao glavna metoda za određivanje ostataka pesticida preporučuje se jedna od kromatografskih metoda (plinska kromatografija ili kromatografija u stupcu). No, zbog nekih ograničenja analitičkih metoda, poželjno je i testiranje nepoznatog biljnog materijala na široke skupine spojeva u odnosu na pojedine pesticide.

2.2. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNE KVALITETE LJEKOVITIH BILJNIH VRSTA

Ljekovite biljne vrste sadrže mnogobrojne bioaktivne sastojke za čiju se izolaciju, identifikaciju i karakterizaciju koriste novije analitičke metode. Tijekom izolacije i identifikacije bioaktivnih komponenti koje su prirodno prisutne u ljekovitim biljkama najčešće se primjenjuju tehnike kao što su: tankoslojna kromatografija, kromatografija na stupcu, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti te nekromatografske tehnike. Spomenute nekromatografske tehnike uključuju imunoispitivanje, spektofotometrijske i elektroforetske tehnike pomoću kojih se odvajaju frakcije koju su kasnije podvrgnute identifikaciji i karakterizaciji pomoću Fourierove transformacije infracrvene spektroskopije (FTIR) ili kombinaciji plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC-MS) (Chikezie i sur., 2015).

Ljekoviti biljni materijali zapravo predstavljaju vrlo složene smjese sastojaka za čiju se identifikaciju danas najčešće koristi kombinacija tekućinske kromatografije s UV-spektroskopijom, masenom spektrometrijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom (Hostettmann i Wolfender, 2001).

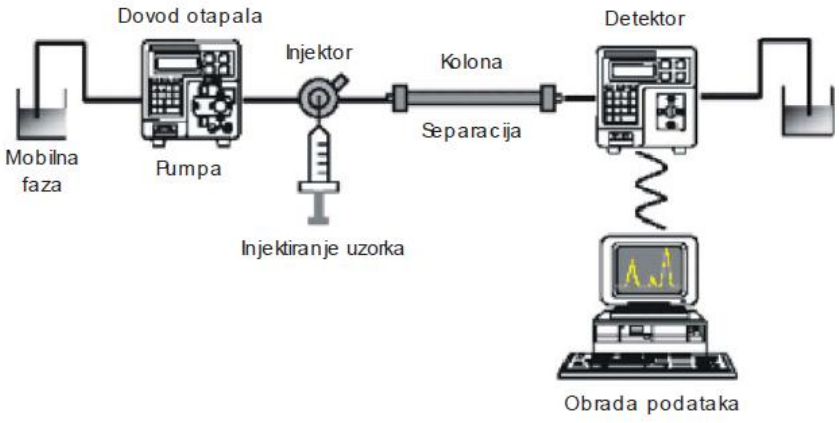
Tekućinska kromatografija s UV spektrofotometrijom koristi se za analizu pojedinih sastojaka prethodno dobivenih biljnih ekstrakata te danas ima široku primjenu u laboratorijima. Navedena tehnika se uglavnom koristi za identifikaciju i karakterizaciju spojeva kao što su polifenolni antioksidansi.

Masena spektroskopija jedna je od najosjetljivijih metoda koja se koristi u analitičkoj kemiji. Tom metodom moguće je dobiti informacije o molekularnoj masi i strukturi ispitivanog analita. Hostettmann i Wolfender navode kako se kombinacija tekućinske kromatografije s masenom spektroskopijom (LC/MS) počela koristiti u analitičkoj kemiji od sredine 80-tih godina te su od tada razvijeni brojni sustavi i kombinacije tih tehnika. Međutim, brojnim istraživanjima utvrđeno je kako kombinacija tih dviju metoda ima nedostatak jer reakcija jako ovisi o prirodi spojeva koji se analiziraju. Budući da je dobiveni biljni ekstrakt kompleksna smjesa kemijskih spojeva vrlo je teško pronaći LC/MS uvjete koji bi bili optimalni za ionizaciju kemijskih spojeva prisutnih u analiziranom biljnom ekstraktu.

Jedna od spektroskopskih metoda koja se koristi za određivanje strukture organskih spojeva u biljnim ekstraktima je i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). NMR se temelji na interakciji magnetskog momenta jezgre s vanjskim magnetskim poljem uz pobudu jezgri s radiovalnim zračenjem (Neri i Tringali, 2001). Navedena tehnika se već duže vrijeme također koristi u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom. Najveći nedostatak LC/NMR metode je u tome što je vrlo teško pratiti rezonanciju analita kada je prisutnost rezonancije mobilne faze mnogo veća od rezonancije analita. Međutim, taj je problem riješen zahvaljujući vrlo pouzdanoj i brzoj tehnici potiskivanja otapala (Hostettmann i Wolfender, 2001).

2.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je specifičan oblik kolonske kromatografije, koja danas predstavlja jednu od najvažnijih metoda analitičke kemije (Malviya i sur., 2010; Bhardwaj i sur., 2015). Glavni cilj HPLC metode je separacija, identifikacija i kvantifikacija spojeva prisutnih u uzorcima koji su topljivi u tekućem mediju te separacija spojeva od nečistoća koje se mogu pojaviti kao posljedica reakcija razgradnje bioaktivnih komponenata (Bhardwaj i sur., 2015). Tekućinski kromatograf na kojem se može provesti opisana analiza sastoji se od sustava za unošenje uzorka, spremnika mobilne faze i sustava za obradu otapala (uklanjanje otopljenih plinova), crpki za visoke tlakove, kolone, detektora te spremnika za sakupljanje otpada (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz HPLC sustava (Nesek, 2004)

Otopina uzorka nanosi se na kolonu poroznog materijala, koja predstavlja stacionarnu fazu, ručnim ili automatskim injektorom tzv. autosamplerom, dok se tekuća tj. mobilna faza crpi kroz kolonu pod povišenim tlakom. Vrijeme koje je potrebno mobilnoj fazi da prođe kroz kolonu označava se kao t_M. Kromatografska kolona zapravo je zatvorena cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, koja je ispunjena nepokretnom odnosno stacionarnom fazom i u kojoj se usred različitih fizikalno-kemijskih interakcija odvija razdvajanje spojeva prisutnih u analiziranom uzorku. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze, a može se temeljiti na:

- razdiobi
- adsorpciji
- ionskoj izmjeni
- raspodjeli prema veličini čestica te
- stereokemijskim interakcijama.

Vrijeme od injektiranja analita u tok mobilne faze do vremena kada pik analita izađe iz kolone i uđe u detektor naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (Rt). Spojevi koji su eluirani iz kromatografske kolone detektiraju se primjenom specifičnih detektora kojima se utvrđuje promjena sastava eluenta mjerenjem nekog njegovog fizikalnog ili kemijskog svojstva. Postoji više vrsta detektora koji se mogu koristiti za detekciju eluiranih spojeva, a neki od njih su: spektrofotometrijski detektori koji rade na principu monokromatske ili polikromatske detekcije (detektor s nizom dioda); spektrofluorimetrijski (fluorescentni) detektori; detektori koji mjere indeks refrakcije (loma) svjetlosti (RI detektor) (Nigović i sur., 2007.) Nakon detekcije eluiranih spojeva kao rezultat kromatografske analize dobiva se kromatogram iz kojeg se mogu očitati sljedeći podaci: retencijsko vrijeme izlaženja pikova (spojeva), širina, visina i površina ispod pikova te udaljenost između pikova. Usporedbom vremena zadržavanja (t_R) (i apsorpcijskih spektara u slučaju UV/Vis detekcije) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja (i apsorpcijskim spektrima) vanjskih standarda, vrši se identifikacija izdvojenih pikova na kromatogramu, pri čemu svaki pik treba odgovarati jednom spoju. Površina pika osnovni je podatak za kvantifikaciju prethodno identificiranih spojeva, a ovisi o koncentraciji sastojaka u uzorku i odazivu detektora spram tog analita. Za kvantitativno određivanje identificiranih spojeva koriste se jednadžbe baždarnih krivulja odgovarajućih standarda.

2.3.1. Podjela HPLC metoda

Vrste tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koje se najčešće koriste u analizama:

1) **kromatografija normalnih faza** – kod ove metode stacionarna faza je polarna dok je mobilna faza nepolarna. Odvajanje analita temelji se polarnosti, a adsorpcijska snaga se povećava povećanjem polariteta analita i interakcijama između polarnog analita i polarne stacionarne faze čime se ujedno produžuje vrijeme eluacije analita iz kolone.
2) **kromatografija obrnutih faza** – kod ove metode stacionarna faza je nepolarna dok je mobilna faza polarna. Odvajanje analita temelji se na hidrofobnim interakcijama koje su rezultat repulzije između polarnog eluensa, relativno nepolarnog analita i nepolarne stacionarne faze.
3) **ionsko-izmjenjivačka kromatografija** – kod ove metode razdvajanje analiziranih spojeva temelji se na naboju analiziranih spojeva. Razdvajanje analiziranih spojeva karakterizirano je prirodom i snagom kiselinskih ili bazičnih funkcionalnih skupina vezanih na nepokretnoj fazi te vrsti iona u analitu koji se razdvajaju.
4) **kromatografija isključenjem (gel kromatografija)** – kod ove metode razdvajanje analiziranih spojeva vrši se na temelju veličine analiziranih spojeva. Ova tehnika se koristi za određivanje molekularne mase polisaharida te je pogodna za određivanje tercijarne i kvaterne strukture proteina.
5) **bioafinitetna kromatografija** – razdvajanje analiziranih spojeva temelji se na reverzibilnim interakcijama između proteina i liganada. Odlika ove tehnike je što se već u jednom koraku može postići vrlo visoki stupanj čistoće analiziranih spojeva (Malviya i sur., 2010).

2.4. VALIDACIJA METODE

Kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka potrebna je validacija analitičkih metoda. Validacija analitičke metode može se definirati kao proces za koji je laboratorijskim istraživanjima utvrđeno da izvedbene značajke metode zadovoljavaju uvjete za namjeravanu

analitičku primjenu (Bhardwaj i sur., 2015; Gupta i sur., 2012). Smatra se da je validaciju nužno provesti:

- pri uvođenju nove metode
- prilikom modifikacije već postojeće metode
- nakon svake promjene ili većeg servisa mjernog instrumenta
- prilikom utvrđivanja standardne metode
- za metode razvijene u vlastitom laboratoriju
- kada se rezultati dobiveni normiranom metodom s vremenom mijenjaju
- kada se normirana metoda koristi u različitim laboratorijima, ili ju u istom laboratoriju izvode različiti analitičari na različitim instrumentima (tzv. konfirmacija) (Ermer, 2005).

Rezultati dobiveni validacijom mogu se koristiti za procjenu kvalitete, pouzdanosti i dosljednosti analitičkih podataka što je sastavni dio dobre analitičke prakse (Bhardwaj i sur., 2015). Tijekom validacije određuju se izvedbene značajke, koje su definirane prema Codex-u Alimentarius-u, ISO-u, IUPAC-u ili prema alternativnim metodama poput ispitivanja u jednom laboratoriju (unutarnja validacija). Izvedbene značajke koje se određuju pri validaciji neke analitičke metode su:

- specifičnost/selektivnost
- linearnost i radno područje
- preciznost
    - ✓ ponovljivost, eng. repeatability
    - ✓ obnovljivost, eng. reproducibility
- točnost
- granica detekcije, eng. limit of detection (LOD)
- granica kvantifikacije, eng. limit of quantification (LOQ)
- robusnost metode (Bhardwaj i sur., 2015; Gupta i sur., 2012).

2.4.1. Specifičnost/ selektivnost

Specifičnost/selektivnost metode je mjera sposobnosti da točno i specifično mjeri analit u prisutnosti komponenata koje mogu biti prisutne u matriksu, kao što su nečistoće, razgradni produkti, placebo (Sabir i sur., 2013). Specifičnost i selektivnost su zapravo dva različita svojstva metode, ali se u praksi često poistovjećuju. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Metoda kojom se može određivati više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom (Lazarić, 2012).

2.4.2. Linearnost i radno područje

Linearnost analitičkog postupka je njegova sposobnost produciranja rezultata provedenog ispitivanja koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku (Bhardwaj i sur., 2015). Ovaj parametar određuje se mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog spoja pri čemu se preporučuje najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja. Procjenjuje se na dva načina: matematički i grafički. Matematički se preko linearne regresije izrazi jednadžba pravca ($y = ax + b$) i izračuna koeficijent korelacije (k). Nagib pravca (a) parametar je koji izravno ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Grafički prikazi ovisnosti signala o koncentraciji analita važni su zbog mogućnosti vizualnog nadzora. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza:

- grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije
- grafički prikaz relativnih signala (omjer signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale (Lazarić, 2012).

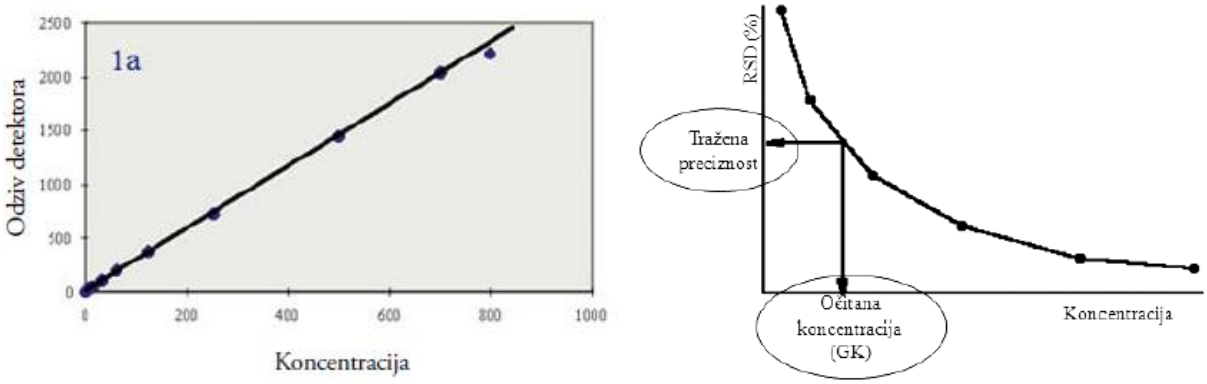
Radno područje je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita (granice su uključene) u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost (Lazarić, 2012). Određivanje tog parametra provodi se iz prikaza linearnosti metode (slika 2).

2.4.3. Preciznost

Preciznost metode je stupanj podudaranja rezultata kada se postupak primijeni više puta uzastopno na više uzorkovanja homogenog uzorka. Na taj se način određuju slučajne pogreške metode. Ovisno o uvjetima u kojima se preciznost određuje razlikujemo:

- ponovljivost – mjerenje se provodi pod istim uvjetima (isti analitičar, ista aparatura, isti reagensi, u kratkim vremenskim intervalima)
- međupreciznost – mjerenje se provodi pod različitim uvjetima (isti laboratorij, više analitičara, različiti instrumenti, reagensi iz različitih boca) s ciljem potvrde da će metoda nakon razvijanja dati iste rezultate tijekom uporabe u laboratoriju
- obnovljivost - odnosi se na mjerenje izvedeno na identičnom uzorku u različitim laboratorijima s ciljem potvrde da će metoda dati isti rezultat u različitim laboratorijima, a izvodi se kada se analitička metoda želi standardizirati.

Prikazani rezultati trebaju sadržavati standardnu devijaciju (SD) koja predstavlja mjeru raspršenosti podataka u skupu te relativnu standardnu devijaciju (RSD) izraženu u postocima, koja se dobiva dijeljenjem standardne devijacije sa srednjom vrijednosti (Gupta i sur., 2012; Sabir i sur., 2013).



Slika 2. Grafički prikaz linearnosti i granice kvantifikacije s zadanom preciznošću (Lazarić, 2012)

2.4.4. Točnost

Točnost metode predstavlja bliskost rezultata dobivenih ovom metodom u odnosu na pravu vrijednost, tj. podudaranje nađene količine aktivne komponente. Rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak iskorištenja (recovery).

2.4.5. Granica detekcije/kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) je najmanja koncentracija ispitivane tvari koja se može detektirati, ali ne i nužno kvantificirati. Za razliku od granice detekcije, granica kvantifikacije (LOQ) predstavlja najnižu koncentraciju kod koje je moguća jednoznačna identifikacija ispitivane tvari i sa kojom se postiže prihvatljivo iskorištenje (slika 2).

2.4.6. Robusnost

Predstavlja stupanj reproducibilnosti rezultata dobivenih analizom istog uzorka kod različitih uvjeta ispitivanja. Kod robusnosti metode ispituje se stabilnost pripremljenog uzorka, utjecaj pokretne faze, utjecaj različitih kolona te utjecaj promjene instrumenta.

2.5. PRIMJENA HPLC-a

HPLC metoda, kao što je već navedeno, koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju spojeva prisutnih u analiziranom biljnom ekstraktu. Za razliku od spomenute tzv. analitičke HPLC metode, preparativna HPLC metoda koristi se za izolaciju i pročišćavanje izoliranih spojeva iz analiziranog biljnog materijala. Malviya i suradnici (2010) u svom radu navode široku primjenu HPLC metode kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Primjer primjena HPLC metode u različitim granama djelatnosti (Malviya i sur., 2010)

Primjena HPLC-a	
Farmaceutska industrija	Farmakokinetika - otpuštanje aktivnih tvari iz farmaceutskih oblika Određivanje roka trajanja farmaceutskih proizvoda Identifikacija aktivnih tvari u farmaceutskom obliku Kontrola kvalitete
Prehrambena industrija	Osiguranje kvalitete bezalkoholnih pića i vode za piće Analize piva Analiza šećera u voćnim sokovima Analiza policikličkih tvari u povrću
Forenzika	Kvantifikacija lijekova u biološkim uzorcima Identifikacija anaboličkih steroida u serumu, urinu, znoji i kosi Analiza tekstilnih bojila Određivanje kokaina i metabolita u krvi
Medicina	Kvantifikacija iona u ljudskom urinu Analiza antibiotika u krvnoj plazmi Procjena bilirubina i bilivirdina u krvnoj plazmi u slučaju hepatičkog poremećaja Detekcija endogenih neuropeptida u izvanstaničnoj tekućini mozga
Zaštita okoliša	Određivanje fenolnih spojeva u vodi za piće Identifikacija difenhidramina u sedimentiranim uzorcima Biomonitoring onečišćenja

U tablici 2 prikazani su rezultati istraživanja polifenolnog sastava biljnih ekstrakata dobivenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti iz navedenih ljekovitih biljaka. S obzirom da većina polifenolnih spojeva dobro apsorbira u UV i vidljivom području, za njihovu detekciju najčešće su primjenjivani UV-Vis detektori. Otapala koja se najčešće koriste u reverzno faznoj kromatografiji su: voda, metanol, acetonitril i druga razna organska otapala. Često se u otapalo dodaje neka od navedenih kiselina: mravlja, octena ili fosforna kako bi se spriječila ionizacija na stacionarnoj fazi. Dodavanjem kiselina dolazi do smanjenja pH vrijednosti što utječe na brzinu eluacije. Uz navedene polifenolne spojeve koji su se identificirali u biljnim ekstraktima, navedeni su uvjeti analize i otapala koja su se koristila tijekom provođenja analize.

Tablica 2. Pregled primjene HPLC tehnike i uvjeta analize u znanstvenim istraživanjima polifenolnog sastava u ljekovitim biljkama

Uzorak	Gospina trava (*Hypericum perforatum*)	Kopriva (*Urtica dioica*)	Majčina dušica (*Thymus serpyllum*)	Matičnjak (*Melissa officinalis*)	Preslica (*Equisetum arvense*)
Otapala	0.1 M vodena otopine octene kiseline (A) metanol-acetonitril (5:4, v/v) (B)	otapalo A (2% octene kiseline, 10% metanola i 88% vode) otapalo B (2% octene kiseline, 90% metanola i 8% vode)	otapalo A (5% mravlje kiseline u acetonitrilu) Otapalo B (5% mravlje kiseline u vodi)	0.05% otopina trifluorooctene kiseline u metanolu (A) voda (B)	acetonitril (A) 0,5% mravlje kiseline u vodi (B)
Uvjeti analize	gradijent eluacije: početni 10% B; 0–18 min 10–30% B; 18–25 min 30–90% B; 25–40 min 90% B protok: 1 mL/min Vi = 5 µL T sobna	gradijent eluacije: 0–11 min 100% A; 30–40 min 35% A i 65% B; 42 min 100% A protok: 1 mL/min Vi = 20 µL T = 40°C	gradijent eluacije: 0 min 10% A u B; nakon 25 min 40% A; nakon 30 min 70% A protok: 0,9 mL/min Vi = 20 µL T = 20°C	gradijent eluacije: gradijentno: 0–25 min 15–75% A; izokratno: 25–30 min 75% A; gradijentno: 30–35 min 75–15% A protok: 1 mL/min Vi = 10 µL T = 30°C	gradijent eluacije: 0 min 10% A; 25 min 20% A; 45 min 30% A; 47 min 100% A protok: 1 mL/min Vi = 10 µL T = 25°C
Spojevi	amentoflavon hiperforin hipericin izokvercitrin klorogenska kiselina kvercetin kvercitrin rutin	elaginska kiselina fumarinska kiselina kvercetin mircetin p-kumarinska kiselina rutin siriginska kiselina vanilinska kiselina	eriocitrin eriodiktiol kafeinska kiselina luteolin luteolin-7-O- β glukuronid luteolin-7-O-rutinozid ružmarinska kiselina	ferulinska kiselina galna kiselina kafeinska kiselina klorogenska kiselina ružmarinska kiselina siringinska kiselina	5-glukozid luteolin ferulinska kiselina izokvercetin kafeinska kiselina klorogenska kiselina
Referenca	Pellati i sur. (2005)	Otles i Yalcin (2012)	Fecka i Turek (2008)	Arceusz i Wesolowski (2013)	Oniszczuk i sur. (2014)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Ljekovite biljne vrste ispitivane u ovom radu podrijetlom iz sjeveroistočnih (Žumberak, Hrvatska) i primorskih krajeva (Dalmacija) Hrvatske, kupljene su od lokalnog proizvođača čajeva Suban d.o.o. te su prikupljene tijekom godine. Sve biljne vrste bile su osušene i dostavljene u većoj količini (2 kg) kako bi se osigurala homogenost i reprezentativnost uzoraka. Za istraživanje je korišteno šesnaest biljnih vrsta: lavanda (*Lavandula angustifolia* L.), gospina trava (*Hypericum perforatum* L.), neven (*Calendula officinalis* L.), maslina (*Olea europaea* L.), stolisnik (*Achillea millefolium* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.), menta (*Mentha piperita* L.), preslica (*Equisetum arvense* L.), maslačak (*Taraxacum officinale* L.), kopriva (*Urtica dioica* L.), kamilica (*Matricaria recutita* L.), lipa (*Tilia cordata* L.), kadulja (*Salvia officinalis* L.), trputac (*Plantago lanceolata* L.), matičnjak (*Melissa officinalis* L.) i ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.*)*.

3.1.2. Priprema biljnih ekstrakata

Biljni ekstrakti pripremljeni su prelijevanjem 2 g biljnog materijala sa 50 mL destilirane vode zagrijane do vrenja. Ekstrakcija je provedena na klasičan način uz povremeno miješanje staklenim štapićem kroz 30 min. Nakon ekstrakcije uzorci su procijeđeni kroz metalnu cjediljku i odmah analizirani. Svakom biljnom ekstraktu određen je prinos (udio suhe tvari) metodom sušenja do konstantne mase na 105°C prema modificiranoj AOAC 930.15 metodi (1990b).

Dio biljke korišten u ovom ispitivanju te prinos ekstrakcije određen u pripremljenim vodenim ekstraktima navedenih biljnih vrsta prikazani su na slici 3.

Lavanda, cvijet – 0.58%

Gospina trava, cvijet i list – 0.30%

Neven, cvijet i list – 1.00%

Maslina, list – 0.59%

Stolisnik, cvijet – 0.69%

Majčina dušica, cvijet – 0.33%

Paprena metvica, list – 0.76%

Preslica, zelen – 0.57%

Maslačak, cvijet i list – 1.17%

Kopriva, list – 0.74%

Kamilica, cvijet – 1.02%

Lipa, cvijet i list – 0.55%

Kadulja, cvijet i list – 0.47%

Trputac, list – 2.63%

Matičnjak, list – 0.56%

Ružmarin, list – 1.12%

Slika 3. Dio biljne vrste korišten u istraživanju i prinos pripremljenih ekstrakata (%)

3.1.3. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

Određivanje udjela ukupnih polifenola

1) Folin-Ciocalteau reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
2) 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
3) Galna kiselina (za konstruiranje baždarne krivulje), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

1) Klorovodična kiselina (37%-tna), Kemika (Hrvatska)
2) Arnow reagens
    - 10%-tna vodena otopina natrijevog nitrita Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska) i natrijevog molibdata (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
3) Natrijev hidroksid (8,5 %-tna vodena otopina), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela flavona i flavonola

1) Metanol (75%-tni), Carlo-Erba (Peypin, Francuska)
2) Aluminijev klorid (10%-tni), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
3) 1 M kalijev acetat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

1) Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
2) 140 mM otopina kalijevog persulfata, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
3) 7 mM otopina 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
4) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Razvoj i validacija HPLC metode

1) Galna kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
2) Protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
3) *p*-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
4) Kaftarinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
5) Klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
6) Kava kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
7) Vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
8) Ferulinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
9) *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
10) Cikorinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
11) Siriginska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
12) Ružmarinska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
13) Elaginska kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
14) *trans*-cimetna kiselina (Sigma-Aldrich, USA)
15) Luteolin-7-O-glukozid (Sigma-Aldrich, USA)
16) Apigenin-7-O-glukozid (Sigma-Aldrich, USA)
17) Kvercetin-3-O-rutinozid (rutin) (Sigma-Aldrich, USA)
18) Kvercetin-3-O-glukozid (Sigma-Aldrich, USA)
19) Kampferol-3-glukozid (Sigma-Aldrich, USA)
20) Miricetin (Sigma-Aldrich, USA)
21) Kvercetin (Sigma-Aldrich, USA)
22) Luteolin (Sigma-Aldrich, USA)
23) Kampferol (Sigma-Aldrich, USA)
24) Apigenin (Sigma-Aldrich, USA)
25) Metanol, HPLC čistoće, Carlo Erba (Peypin, Francuska)
26) 0,1%-tna vodena otopina *o*-fosforne kiseline Kemika (Zagreb, Hrvatska)

3.1.4. Aparatura i pribor

Standardno laboratorijsko stakleno i plastično posuđe volumena 0-100 mL (čaše, odmjerne tikvice, pipete, falkon i eppendorf kivete), lijevci, epruvete i štapići za miješanje. Od metalnog pribora korišteni su cjediljka, tronožac, azbestna mrežica. Za dodavanje malih i preciznih volumena korištene su automatske mikropipete od 20-1000 μL.

Priprema ekstrakta

1) Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
2) Plamenik
3) Magnetska miješalica

Spektrofotometrijske metode

1) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
2) Spektrofotometar, Helios γ (ThermoSpectronic, Velika Britanija)

Razvoj i validacija HPLC metode

1) Agilent 1100/1200 Series HPLC uređaj,Agilent (Santa Clara, USA
2) Detektor s nizom dioda (DAD), Agilent (Santa Clara, USA)
3) RP HPLC kolona ACE C-18, Agilent (Santa Clara, USA) (250 x 4.6 mm, veličina stacionarne faze 5 μm)
4) Celulozno-acetatni mikrofilteri 0,45 μm (Nylon Membranes, Supelco, Bellefonte, USA)
5) Ultrazvučna kupelj, Transsonic 460 (Elma, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije, u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988), pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U staklene epruvete odpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 µL uzorka, 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 µL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te tako dobivenu vrijednost koristiti za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0{,}0010x - 0{,}0001 \qquad [1]$$

gdje su:

x – udjel ukupnih polifenola (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u dvije paralelne probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK)/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene vrijednosti moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.2. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina

Princip metode:

Određivanje hidroksicimetnih kiselina bazira se na reakciji kiselinske hidrolize koja je popraćena nastankom ružičasto-crvenkastog obojenja čiji se intenzitet određuje mjerenjem apsorbancije na 490 nm, pri čemu je udjel hidroksicimetnih kiselina direktno proporcionalan intenzitetu obojenja u ispitivanom uzorku (Matkowski, 2008).

Postupak rada:

Za određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina, 500 µL mikrofiltriranog uzorka pomiješa se u epruveti sa 1 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 1 mL Arnow-og reagensa, 1 mL 8,5 %-tne vodene otopine NaOH te se doda 1,5 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete se zatim izmiješa te se apsorbancija odmah zatim očita na 490 nm (Matkowski, 2008). Slijepa proba umjesto uzorka sadrži destiliranu vodu.

Udjel hidroksicimetnih kiselina izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0{,}0025x + 0{,}0054 \qquad [2]$$

gdje su:

x – udjel kafeinske kiseline (mg/L),

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 490 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kafeinske kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel hidroksicimetnih kiselina u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela hidroksicimetnih kiselina provedeno je u dvije paralelne probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata kafeinske kiseline/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene koncentracije moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.3. Određivanje udjela flavona i flavonola

Princip metode:

Reakcijom aluminijevog klorida s keto skupinom na C-4 atomu ugljika ili s hidroksilnom skupinom na C-3 ili C-5 skupinom u molekulama flavona i flavonola nastaje stabilni, žuto obojeni kompleks. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 435 nm, a intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu flavona i flavonola (Chang i sur., 2002).

Postupak rada:

Za određivanje udjela flavona i flavonola u staklenu epruvetu odpipetira se 500 μL uzorka te se doda 1,5 mL 75%-tnog metanola, 100 μL 1M KCH_2COOH, 100 μL $AlCl_3$ i 2,8 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa se dobro homogenizira te se neposredno nakon toga očita apsorbancija na 435 nm. Potrebno je pripremiti slijepu probu za svaki uzorak, koja umjesto 10% $AlCl_3$ sadrži istu količinu vode te slijepu probu za sve uzorke, koja umjesto uzorka sadrži ekvivalentnu količinu (500 μL) destilirane vode.

Udjel flavona i flavonola izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 0{,}0076x - 0{,}0344 \qquad [3]$$

gdje su:

x – udjel kvercetina (mg/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 435 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard kvercetina, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L), određuje se udjel flavona i flavonola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela flavona i flavonola provedeno je u dvije paralelne probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata kvercetina/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene koncentracije moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta-ABTS metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina $ABTS^{+}$ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 μL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti s otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0.5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije $ABTS^{+}$ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi 0,70 ± 0,02.

Za provedbu analitičkog određivanja, volumen od 40 μL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine $ABTS^+$ radikala u tamnoj epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se, umjesto uzorka, 40 μL vode pomiješa s istom količinom reagensa (4 mL otopine $ABTS^+$ radikala).

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA, koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0{,}303x + 0{,}0006 \qquad [4]$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a/L)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol/L), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provedeno je u dvije paralelne probe (n = 2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Troloxa/g uzorka. Ako je u postupku korišten razrijeđen uzorak, dobivene koncentracije moraju se pomnožiti s faktorom razrijeđenosti originalnog uzorka (razrjeđenjem).

3.2.5. Određivanje udjela polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Postupak rada

Analiza polifenolnih spojeva u ispitivanim biljnim ekstraktima provedena je kromatografijom obrnutih faza na ACE C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) koloni (nepolarna stacionarna faza), eluacijom polarnim otapalima na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata. Zbog velikog broja botanički nesrodnih biljnih vrsta ispitivanih u ovom radu, ispitana je učinkovitost 5 različitih metoda (dostupnih iz literature), s kromatografskim uvjetima prikazanim u tablici 3.

U tu svrhu, 6 biljnih vrsta (stolisnik, kopriva, maslačak, ružmarin, kamilica, trputac) analizirano je primjenom svih dolje navedenih metoda, te su kvantificirana 4 reprezentativna polifenolna spoja (klorogenska kiselina, kafeinska kiselina, rutin i kvercetin).

Tablica 3. Parametri kromatografskih analiza primijenjenih i ispitanih u svrhu razvoja nove metode

	Metoda 1	**Metoda 2**	**Metoda 3**	**Metoda 4**	**Metoda 5**
Sastav mobilne faze	A – 2% mravlja kiselina u vodi B - 2% mravlja kiselina u metanolu	A – 0,1% o-fosforna kiselina u vodi B - 0,1% o-fosforna kiselina u metanolu	A –o-fosforna kiselina u vodi (pH=2.5) B – Acetonitril (100%)	A – 0.02% trifluorooctena kiselina u vodi B - 0.02% trifluorooctena kiselina u metanolu	A – 0,1% o-fosforna kiselina u vodi B - 0,1% o-fosforna kiselina u metanolu
Gradijent	0 min: 10% B 25 min: 40% B 45 min: 70% B	0-10 min: 40-50% B 10 min: 50% B 15 min: 60% B 25 min: 60% B	0 min: 95% A 40 min: 55% A 55 min: 0% A 56 min: 95% A 65 min: 95% A	5 min: 25% B 10 min: 30% B 18 min: 45% B 25 min: 80% B 30 min: 80% B 40 min: 25% B	0-10 min: 40-50% B 10 min: 50% B 15 min: 60% B 25 min: 60% B
Protok	0,9 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	0,5 mL/min	0,7 mL/min
Temperatura kolone	25°C	30°C	30°C	25°C	25°C
Duljina trajanja analize	45 min	25 min	65 min	40 min	30 min
Referenca	Belščak-Cvitanović i sur. (2012)	Wang, Provan i Helliwel (2004)	Durling i sur. (2007)	Wen i sur. (2005)	Wang, Provan i Helliwel (2004)

U svrhu postizanja zadovoljavajućeg razdvajanja analita, na temelju rezultata dobivenih primjenom prethodno navedenih HPLC metoda na 6 biljnih vrsta, optimirani su kromatografski parametri za definiranje jedinstvene HPLC metode prema kojoj su analizirani svi daljnji uzorci biljnih ekstrakata. Optimalno razdvajanje komponenata postignuto je uspostavljanjem linearnog gradijenta dolje navedenog sastava mobilne faze u vremenu kako slijedi:

Mobilna faza: A – 0,1% *o*-fosforna kiselina u vodi
B - 0,1% *o*-fosforna kiselina u metanolu
Gradijent: 0 min: 10 % mobilne faze B
30 min: 100% mobilne faze B
Protok: 1 mL/min
Temperatura kolone: 25°C
Duljina trajanja analize: 30 min + 5 min (uspostavljanje početnog sastava mobilne faze)

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva

Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću Diode Array Detector-a pri valnim duljinama od 190 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Detekcija bioaktivnih spojeva provedena je snimanjem eluata na valnoj duljini 278 nm (UV područje) pomoću PDA detektora, pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami biljnih ekstrakata. Usporedbom vremena zadržavanja (Rt) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s UV-spektrima standarda identificirani su spojevi na pojedinim kromatogramima. Kvantitativna determinacija spojeva omogućena je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda. Poseban software Chem32 Chromatography Workstation omogućio je prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom.

Koristeći odgovarajuće baždarne pravce pojedinih polifenolnih spojeva, iz vrijednosti dobivenih površina (nakon integracije) identificiranih pikova u kromatogramima ekstrakata, izračunate su pripadajuće koncentracije polifenolnih spojeva. HPLC analize provedene su u duplikatu, a udjeli

pojedinačnih polifenola izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućom standardnom devijacijom.

Priprema standardnih otopina

Standardne otopine svih polifenolnih spojeva, pripremljene su otapanjem standarda (1 mg svakog) u 70%-tnoj otopini metanola (V = 10 mL). Niže koncentracije potrebne za pripremu baždarnih krivulja i validaciju metode dobivene su razrjeđivanjem početnih standardnih otopina u istom otapalu.

3.2.6. Parametri validacije

Linearnost, granice detekcije i kvantifikacije

Linearnost odgovora detektora za pripremljene standarde polifenolnih spojeva određena je pomoću linearne regresije, uzimanjem u obzir raspon koncentracija (od 5% do 75% standardne otopine) standarda i pripadajuće površine.

Granice detekcije i kvantifikacije određene su izračunavanjem omjera signala i šuma. Omjeri signala i šuma korišteni za procjenu granica detekcije i kvantifikacije iznosili su 3:1 za granicu detekcije i 10:1 za granicu kvantifikacije (Parejo i sur., 2004). Statistički se granice detekcije i kvantifikacije mogu odrediti na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbama: GD = 3.3 σ/a, odnosno Kg = 10 s/a pri čemu je a nagib, a standardna devijacija regresijskog pravca.

Preciznost

Ponovljivost odnosno preciznost injektiranja određena je za 5 reprezentativnih standarda polifenolnih spojeva, najzastupljenijih u ispitivanim biljnim ekstraktima, kako slijedi: klorogenska kiselina, kafeinska kiselina, ružmarinska kiselina, luteolin i apigenin. Za izračunavanje ponovljivosti, otopina svakog standarda koncentracije 50 μg/mL injektirana je 10 puta, te je izračunata relativna standardna devijacija (R.S.D.) (Parejo i sur., 2004).

Točnost

Točnost metode određena je analizom udjela 5 prethodno navedenih standarda u biljnim ekstraktima. Uzorcima su nakon ekstrakcije dodane tri različite količine standardnih spojeva (5, 25 i 50 μg/mL), te su uzorci analizirani prema razvijenoj HPLC metodi. Dobivene prosječne količine ciljnih spojeva uspoređene su s teoretskim vrijednostima kako bi se odredio % točnosti metode (Parejo i sur., 2004).

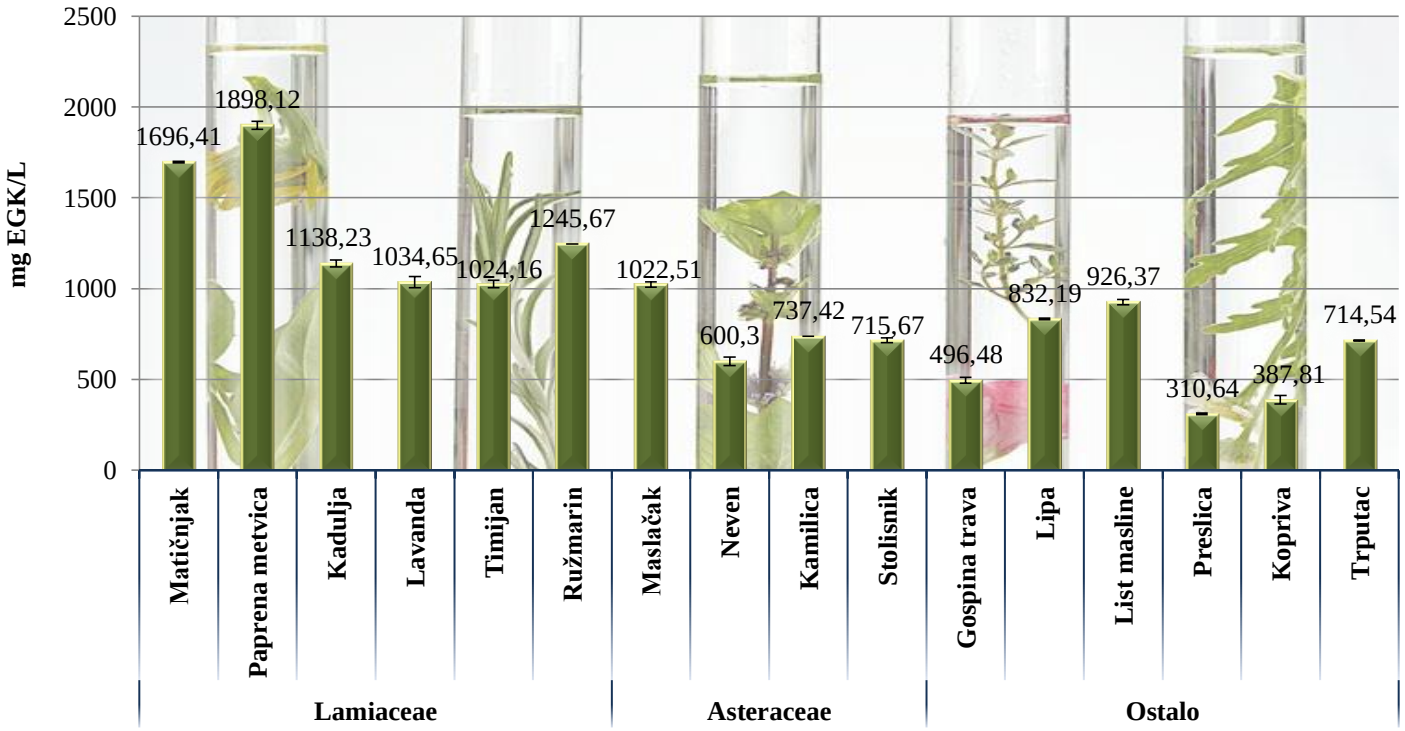
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja udjela polifenolnih spojeva te razvoja i validacije HPLC metode za učinkovitu separaciju i kvantifikaciju velikog broja polifenolnih spojeva u različitim biljnim ekstraktima. Analize su provedene s 16 različitih biljnih vrsta (matičnjak, paprena metvica, kadulja, lavanda, timijan, ružmarin, maslačak, neven, kamilica, stolisnik, gospina trava, lipa, list masline, preslica, kopriva i trputac) koje su zbog jasnoće prikaza podijeljene prema botaničkoj pripadnosti u 3 skupine: (biljke iz porodice *Lamiaceae, Asteraceae* i ostale biljne vrste).

U svrhu preliminarne karakterizacije i usporedbe udjela ukupnih polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta biljnih ekstrakata primijenjene su spektrofotometrijske metode, a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 4-7. Na slici 4 prikazan je udjel ukupnih polifenola, na slici 5 udjel hidroksicimetnih kiselina, dok je na slici 6 prikazan udjel flavona i flavonola. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata prikazan je na slici 7, a određen je pomoću ABTS metode.

Rezultati dobiveni primjenom HPLC analize, te parametri razvoja i validacije nove HPLC metode za separaciju polifenolnih spojeva prikazani su u tablicama 4-8 te na slici 8. Tablica 4 prikazuje udjel odabranih polifenolnih spojeva u pojedinim biljnim vrstama koji su korišteni za ocjenu učinkovitosti separacije i razdvajanja analita (polifenolnih spojeva) primjenom različitih HPLC metoda iz literaturnih izvora. Na slici 8 prikazani su usporedni kromatogrami ekstrakta kamilice dobivenog pomoću 5 primijenjenih HPLC metoda kod različitih kromatografskih uvjeta. Nakon razvoja nove, univerzalne HPLC metode, u tablici 5 dat je prikaz validacijskih parametara, odnosno retencijskih vremena, jednadžbi pravaca, granica kvantifikacije i detekcije standarda polifenolnih spojeva zastupljenih u ispitivanim biljnim ekstraktima. Tablica 6 prikazuje rezultate točnosti i preciznosti novorazvijene HPLC metode korištene za određivanje fenolnih spojeva u biljnim ekstraktima. U tablici 7 prikazan je sadržaj fenolnih kiselina u ispitivanim biljnim ekstraktima koji je određen HPLC metodom, dok je u tablici 8 prikazan sadržaj flavonoida koji je također određen pomoću HPLC metode.

4.1. PRELIMINARNA ANALIZA UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA U BILJNIM EKSTRAKTIMA



Slika 4. Udjel ukupnih polifenola (mg EGK/L) u ispitivanim biljnim ekstraktima

Udjeli ukupnih polifenola svih ispitivanih biljnih ekstrakata prikazani su na slici 4 i izraženi su kao mg EGK/L biljnog ekstrakta.

Najveći udjel ukupnih polifenola, što je vidljivo i na slici 4, određen je u ekstraktima dobivenim iz biljaka koje pripadaju porodici *Lamiaceae*. Unutar navedene porodice, najveći udjel polifenolnih spojeva uočen je u ekstraktu paprene metvice (1898,12 ± 22,01 mg EGK/L biljnog ekstrakta) dok je najmanji uočen u ekstraktu timijana (1024,16 ± 20,21 mg EGK/L biljnog ekstrakta). Zastupljenost ukupnih fenola je nešto manja u ekstraktima dobivenim iz biljaka koje pripadaju porodici *Asteraceae*. Najveći udjel ukupnih polifenola unutar porodice *Asteraceae* sadrži maslačak (1022,51 ± 14,52 mg EGK/L biljnog ekstrakta), a najmanji ekstrakt nevena (600,30 ± 24,07 mg EGK/L biljnog ekstrakta). Na slici 4 vidljivo je kako udjel ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenim iz biljaka koje ne pripadaju porodici *Lamiaceae* i *Asteraceae* značajno varira. Tako je u ekstraktu lista masline zabilježen najveći udjel polifenolnih spojeva (926,37 ± 14,78 mg EGK/L biljnog ekstrakta), dok je u ekstraktu preslice zabilježen najmanji udjel polifenolnih spojeva (310,64 ± 3,15 mg EGK/L biljnog ekstrakta). Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako su biljne vrste iz porodice *Lamiaceae* te maslačak i list masline najbogatiji izvori polifenolnih spojeva, što opravdava njihovu tradicionalnu, ali i sve češću suvremenu uporabu u liječenju mnogih simptoma bolesti.

Katalinić i suradnici (2006) ispitivali su infuzije 70 ljekovitih biljnih vrsta, među kojima su i biljne vrste ispitivane u ovom radu, te su odredili približne, ali i značajno manje udjele ukupnih polifenola za iste biljne vrste u odnosu na one dobivene u ovom diplomskom radu. Najveći udjel polifenola, Katalinić i sur. (2006) odredili su također u *Lamiaceae* biljnim vrstama i to u ekstraktu lista matičnjaka (2218 mg EK/L infuzije), što je nešto više u odnosu na ispitivani ekstrakt u ovom radu, dok je najmanji udjel ukupnih fenola zabilježen kod infuzije lista ružmarina (136 mg EK/L infuzije). Primijećene razlike mogu biti posljedica geografskog porijekla biljnih vrsta, ali i u većoj mjeri uvjeta ekstrakcije na koje značajno utječe odabir parametara ekstrakcije; posebice vrste otapala, temperature ekstrakcije, te načina provedbe ekstrakcije.

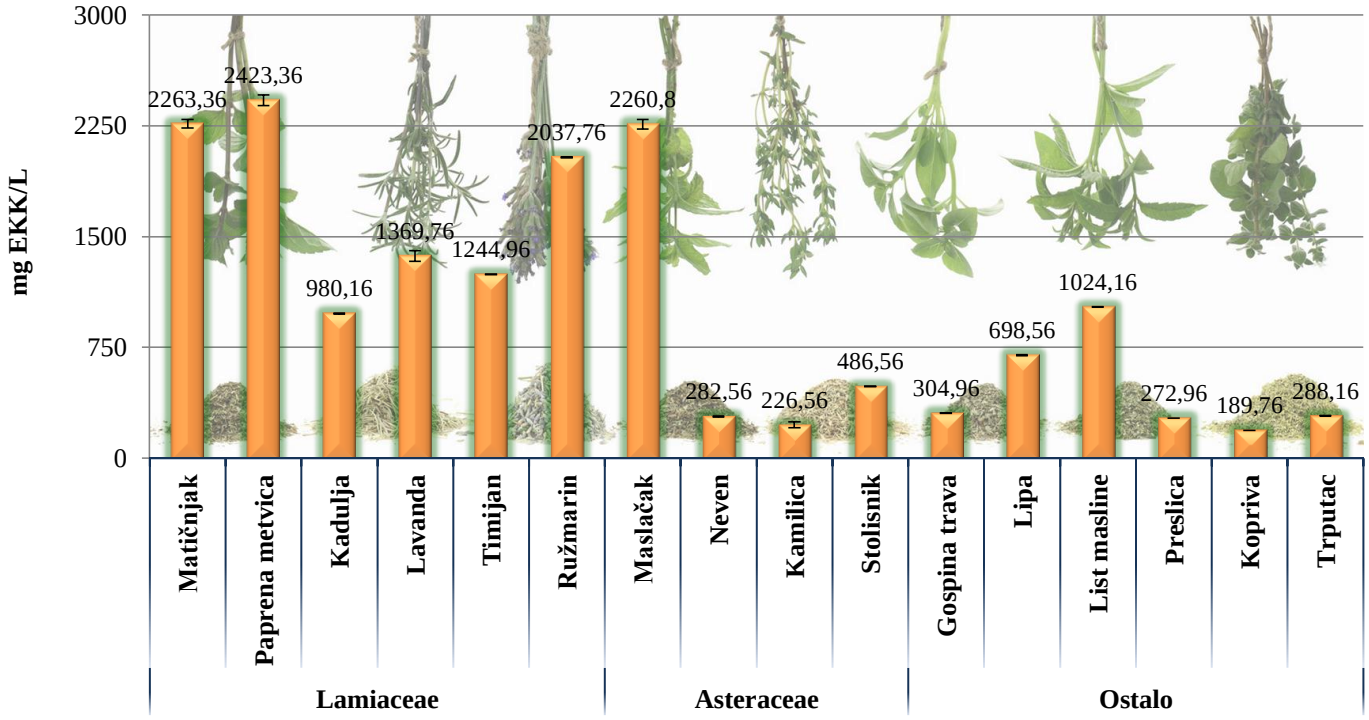
Udjel ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu lista masline ispitan je i u radu Hayesa i suradnika (2011). Udjel ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu lista masline iznosi 1600 mg EGK/L ekstrakta, što je 1,72 puta više u odnosu na vrijednost dobivenu u ovom istraživanju (926,37 ± 14,78 mg EGK/L ekstrakta). Razlike između uočenih vrijednosti za udjel ukupnih

polifenola posljedica su izbora otapala za postupak ekstrakcije te se metanol, u ovom slučaju, pokazao kao bolje otapalo od vode.

Atanassova i Georgieva (2010) provele su istraživanje o udjelu polifenolnih spojeva u metanolnim ekstraktima matičnjaka, paprene metvice i kadulje. U usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom radu, udjel ukupnih polifenola dobiven u istraživanju Atanassove i Geogieve (2010) znatno je manji u odnosu na iste biljne vrste ispitivane u ovom radu, što se može pripisati prethodno spomenutom utjecaju geografskih faktora, ali i načinu provedbe ekstrakcije i korištenom otapalu za ekstrakciju.

Sytar i suradnici (2016) proveli su istraživanje o udjelu polifenolnih spojeva u 26 biljnih vrsta unutar porodice *Lamiaceae*, *Asteraceae* i *Rosaceae*. Najveći udjel ukupnih polifenola određen je u metanolnom ekstraktu kadulje (2230 ± 0,270 mg EKG/L ekstrakta) što je gotovo dvostruko više u odnosu na vrijednost (1138 ± 18,12 mg EGK/L ekstrakta) dobivenu u ovom radu. Iznenađujući je udjel ukupnih polifenola određen u ekstraktu nevena (1125 ± 0,153 mg EGK/L ekstrakta), budući da je ovim istraživanjem određen značajno manji udjel polifenolnih spojeva (600,30 ± 24,07 mg EGK/L ekstrakta). Na udjel polifenolnih spojeva, osim uvjeta ekstrakcije, mogu utjecati i vrijeme berbe biljnog materijala korištenog za ekstrakciju te klimatski uvjeti kojim je biljka tijekom rasta izložena.

Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima drugih istraživanja vidljivo je da je metanol i njegove vodene otopine vrlo često primjenjivano otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz ljekovitih biljnih vrsta. Općenito alkoholi, posebice etanol i metanol karakterizira prisutnost hidroksilne skupine i alifatskog dijela molekule koji omogućavaju solubilizaciju polarnih polifenolnih spojeva te zato djeluju kao dobra otapala za njihovu ekstrakciju. Metanol sadrži manji i fleksibilniji alifatski fragment u usporedbi s drugim alkoholima te stoga bolje „okružuje“ polifenolne spojeve sa supstituiranim ugljikovim atomima u strukturi (kao što su ferulinska, vanilinska i sinapinska kiselina). Zbog toga se metanol vrlo često koristi kao otapalo premda bi se njegova uporaba u svrhu dobivanja funkcionalnih bioaktivnih sastojaka trebala izbjegavati zbog njegove toksičnosti te je u tu svrhu voda mnogo poželjnije otapalo (Abad-Garcia i sur., 2007).

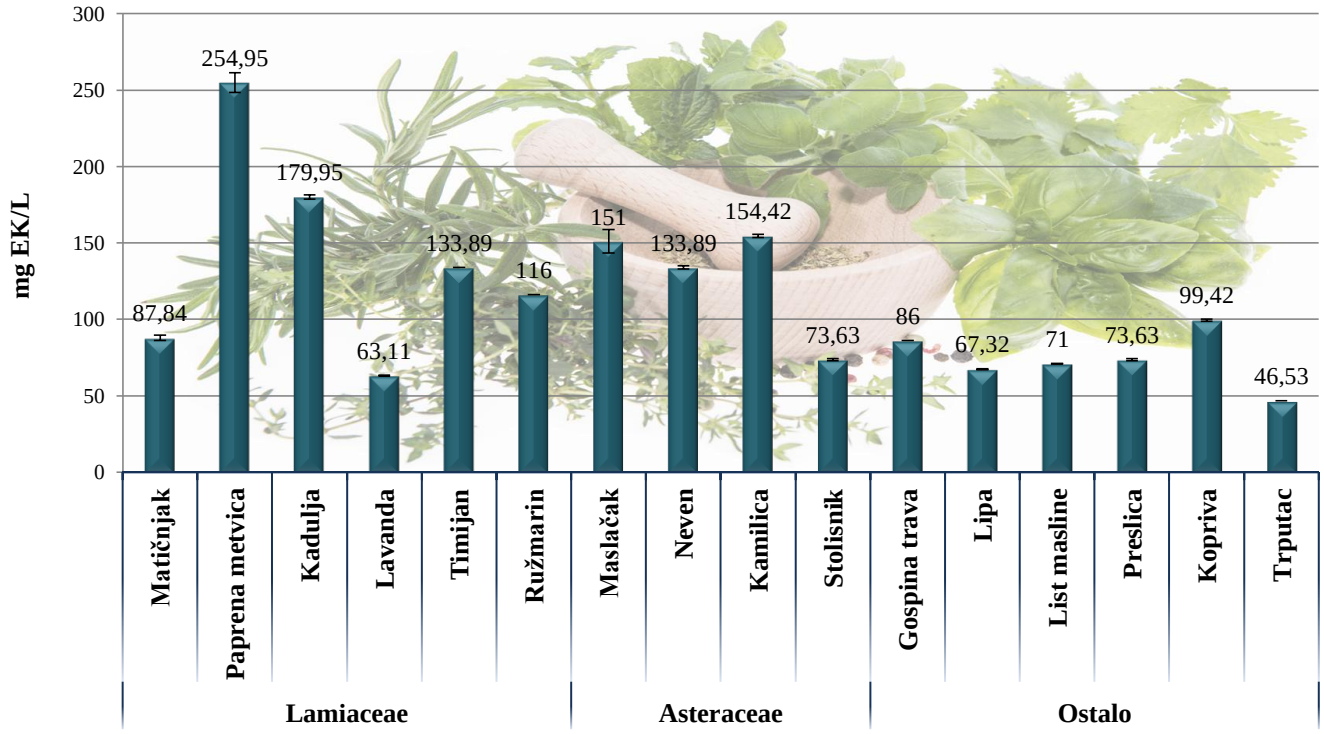


Slika 5. Udjel hidroksicimetnih kiselina (mg EKK/L) u ispitivanim biljnim ekstraktima

Hidroksicimetne kiseline u prirodi su uglavnom prisutne u različitim konjugiranim oblicima ili kao esteri, a najpoznatiji ester tih kiselina je klorogenska kiselina. Kafeinska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina, u visokom udjelu je prisutna u voću, dok je ferulinska kiselina najzastupljenija u žitaricama (Manach i sur., 2004). Udjeli hidroksicimetnih kiselina ispitivanih biljnih ekstrakata prikazani su na slici 5 i izraženi su kao mg kafeinske kiseline/L biljnog ekstrakta.

Udjel hidroksicimetnih kiselina biljnih vrsta unutar porodice *Lamiaceae* značajno varira. Najveći udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u ekstraktu paprene metvice (2423,36 ± 35,28 mg EKK/L ekstrakta), a najmanji u ekstraktu kadulje (980,16 ± 3,21 mg EKK/L ekstrakta). Budući da paprena metvica i matičnjak s obzirom na botaničku klasifikaciju pripadaju porodici usnjača (*Lamiaceae*), njihov najveći udjel hidroksicimetnih kiselina nije iznenađujući. Naime, upravo su biljke iz porodice usnjača karakterizirane visokim udjelom hidroksicimetnih kiselina, posebice ružmarinske, klorogenske i kafeinske kiseline, te se stoga ti polifenolni spojevi i smatraju biomarkerima biljnih vrsta iz porodice *Lamiaceae*.

Biljne vrste koje pripadaju porodici *Asteraceae* karakterizira značajno manji udjel hidroksicimetnih kiselina, uz iznimku ekstrakta maslačka kojeg karakterizira visok udjel hidroksicimetnih kiselina (2260,80 ± 32,01 mg EKK/L ekstrakta). Zabilježena vrijednost udjela hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu maslačka je gotovo identična vrijednosti dobivenoj za ekstrakt matičnjaka (2263,36 ± 28,89 mg EKK/L ekstrakta). Ostale biljne vrste koje ne pripadaju navedenim porodicama sadrže neznatne udjele hidroksicimetnih kiselina, osim ekstrakta lista masline u kojem je također određen značajan udjel hidroksicimetnih kiselina (1024,16 ± 2,43 mg EKK/L ekstrakta). Ekstrakt koprive sadrži najmanji udjel hidroksicimetnih kiselina (189,76 ± 0,08 mg EKK/L ekstrakta), što je više od 10 puta manje u odnosu na biljnu vrstu s najvećim udjelom ovih spojeva. Dobiveni rezultati pokazuju jednak poredak udjela hidroksicimetnih kiselina i udjela ukupnih polifenola u biljnim vrstama što upućuje na činjenicu da su hidroksicimetne kiseline prevladavajuća skupina polifenola u ljekovitim biljnim vrstama. Ovakav rezultat potvrdio je i visok koeficijent linearne korelacije između rezultata udjela ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina u ovom radu ($r = 0.885$).



Slika 6. Udjel flavona i flavonola (mg EK/L) u ispitivanim biljnim ekstraktima

Udjeli flavona i flavonola svih ispitivanih biljnih ekstrakata prikazani su na slici 6 i izraženi su kao mg kvercetina/L biljnog ekstrakta. Budući da su fenolne kiseline i flavonoidi (podskupine flavoni i flavonoli) dominantne skupine polifenola u ljekovitim biljnim vrstama, spektrofotometrijski testovi za određivanje tih spojeva provedeni su u svrhu uključivanja tih parametara kao bioaktivnih pokazatelja u kontroli bioaktivne kvalitete ljekovitog bilja. Upotrijebljena spektrofotometrijska metoda za određivanje flavona i flavonola izvorno je razvijena i primijenjena za analizu propolisa i uzoraka meda. Međutim, u ovom istraživanju korištena je za procjenu udjela flavona i flavonola analizom biljnih ekstrakata.

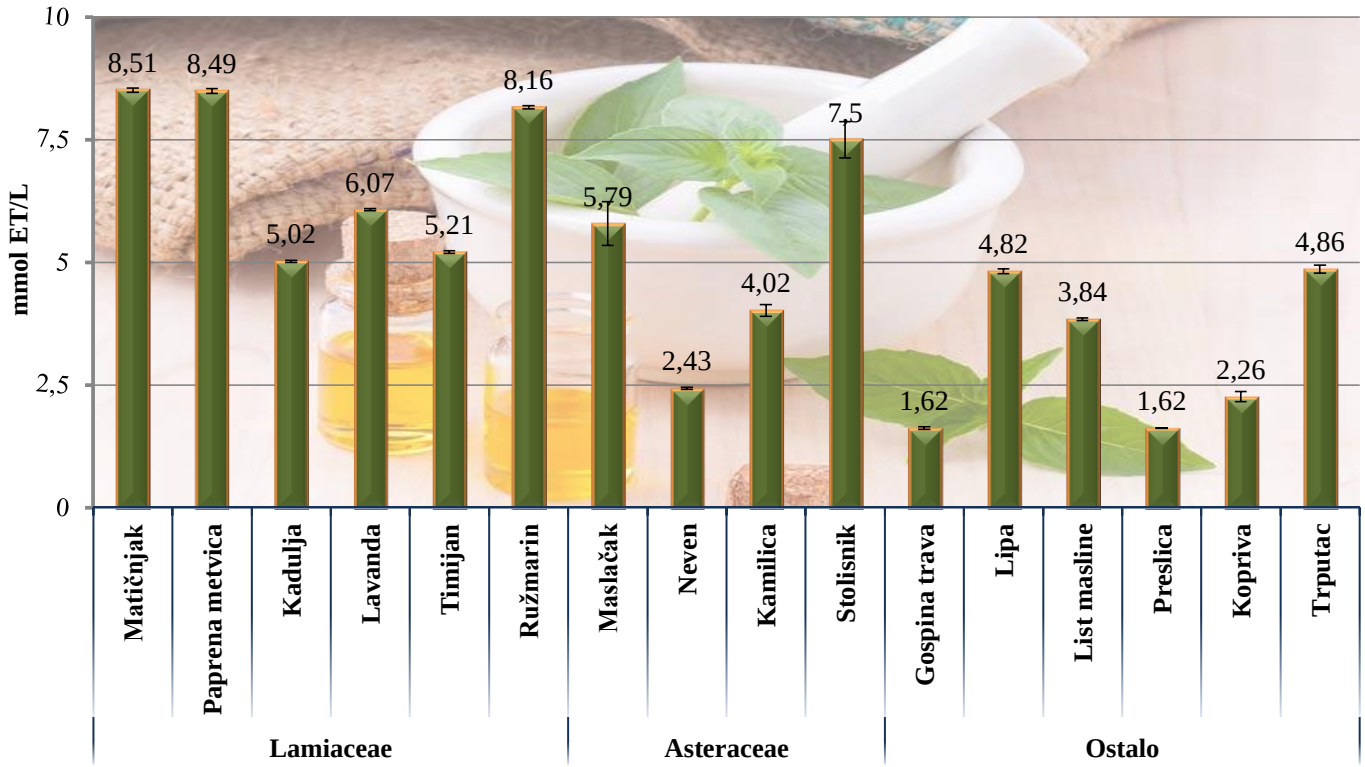
Prema rezultatima prikazanim na slici 6, vidljivo je kako udjel flavona i flavonola u biljnim vrstama značajno varira što se posebice odnosi na biljne vrste koje pripadaju porodici *Lamiaceae*. Unutar navedene porodice, najveći udjel flavona i flavonola određen je u ekstraktu paprene metvice (254,95 ± 6,32 mg EK/L ekstrakta), dok je najmanji određen u ekstraktu lavande (63,11 ± 0,26 mg EK/L ekstrakta). Unutar porodice *Asteraceae*, najveći udjel flavona i flavonola uočen je u ekstraktu kamilice (154,42 ± 1,05 mg EK/L ekstrakta) te je približno jednak ekstraktu maslačka (151,00 ± 7,63 mg EK/L ekstrakta). U biljnim vrstama koje ne pripadaju navedenim porodicama nema značajnijih razlika u udjelu flavona i flavonola, osim u ekstraktu trputca koji sadrži općenito najmanji udjel flavona i flavonola (46,53 ± 0,00) među svim ispitivanim biljnim vrstama.

S obzirom da je spektrofotometrijska metoda primijenjena u ovom radu modificirana i korištena po prvi put za određivanje udjela flavona i flavonola u biljnim ekstraktima, nema dostupnih literaturnih podataka koji bi omogućili usporedbu dobivenih rezultata. Relativna usporedba moguća je jedino uzimanjem u obzir odnos između udjela flavona i flavonola te ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, provođenjem analize linearne korelacije. Na taj način može se utvrditi da niža (r=0.538) uspostavljena korelacija između ukupnih polifenola te flavona i flavonola podrazumijeva da različite kemijske podskupine čine ukupne polifenole, a kojima flavoni i flavonoli doprinose manjim dijelom. Također, između rezultata udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina te flavona i flavonola nije utvrđena visoka korelacija (r = 0.447), za razliku od prethodno navedene visoke korelacije ukupnih polifenola i hidroksicimetnih kiselina, što dokazuje da je kasnija podskupina polifenolnih spojeva zastupljenija u većoj mjeri u biljnim ekstraktima nego podskupina flavona i flavonola. Slične rezultate utvrdili su u svojim istraživanjima Atanassova i Georgieva (2010) te Sytar i suradnici (2016), koji su također

primijetili nejednak trend (nedostatak korelacije) između udjela ukupnih polifenola i flavonoidnih spojeva u ekstraktima ljekovitih biljnih vrsta.

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog primjenom ABTS metode prikazani su na slici 7 i izraženi su kao mmol Trolox-a/L biljnog ekstrakta.

Prema slici 7, vidljivo je kako biljne vrste iz porodice *Lamiaceae* imaju najveći antioksidacijski kapacitet. Unutar navedene porodice najveći antioksidacijski kapacitet karakterizira ekstrakt matičnjaka (8,51 ± 0,04 mmol ET/L), kojeg s vrlo malim odstupanjem prati ekstrakt paprene metvice (8,49 ± 0,05 mmol ET/L). Najmanji antioksidacijski kapacitet unutar porodice *Lamiaceae* određen je za ekstrakt kadulje (5,02 ± 0,02 mmol ET/L). Biljne vrste iz porodice *Asteraceae* karakterizira značajno manji antioksidacijski kapacitet koji varira od biljke do biljke. Prema priloženim rezultatima može se uočiti kako ekstrakt stolisnika ima najveći antioksidacijski kapacitet (7,50 ± 0,37 mmol ET/L), a najmanji ekstrakt nevena (2,43 ± 0,02 mmol ET/L). Sposobnost inhibicije ABTS radikala značajno varira u biljnim vrstama koje ne pripadaju navedenim porodicama. Najveći antioksidacijski kapacitet određen je za ekstrakt trputca (4,86 ± 0,08) što je 1,75 puta manje u odnosu na ekstrakt matičnjaka. Ekstrakt preslice (1,62 ± 0,01), kojeg s vrlo malim odstupanjem prati ekstrakt gospine trave (1,62 ± 0,03), ima najmanji antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih biljnih vrsta pokazuju sličan poredak udjelu ukupnih polifenola ($r = 0,849$) te udjelu hidroksicimetnih kiselina ($r = 0,785$). Međutim, ne postoji jasan odnos s udjelom flavona i flavonola ($r = 0,281$) što ukazuje da ova podskupina polifenolnih spojeva manje doprinosi antioksidacijskim svojstvima biljnih vrsta.



Slika 7. Antioksidacijski kapacitet (mmol ET/L) ispitivanih biljnih ekstrakata određen ABTS metodom

Ivanova i suradnici (2005) ispitivali su antioksidacijski kapacitet bugarskih ljekovitih biljaka primjenom ABTS metode, čime je obuhvaćeno čak osam biljnih vrsta korištenih u ovom radu. Najveći antioksidacijski kapacitet karakterizirao je ekstrakt matičnjaka (4,06 ± 0,31 mmol/L) što je upola manje u odnosu na dobivenu vrijednost (8,51 ± 0,04 mmol ET/L) u ovom radu. Najmanja sposobnost inhibicije $ABTS^{+}$ radikala određena je za ekstrakt trputca (0,51 ±0,08 mmol/L), dok je ovim radom utvrđena veća sposobnost inhibicije spomenutog radikala u ispitivanom ekstraktu (4,86 ± 0,08 mmol ET/L).

Međutim rezultati Wojdyła i suradnika (2007) pokazali su drugačiji poredak antioksidacijskog kapaciteta biljnih ekstrakata određenog primjenom $ABTS^{+}$ radikala: gospina trava > ružmarin > kadulja > stolisnik > matičnjak > maslačak. Takvi rezultati u suprotnosti su s rezultatima dobivenim u ovom radu, te upućuju na značajno veće antioksidacijsko djelovanje ekstrakta gospine trave, u usporedbi s biljnim vrstama porodice *Lamiaceae*. Također primijećeno je da ekstrakt maslačka koji je prema našoj analitičkoj karakterizaciji uz *Lamiaceae* biljne vrste bio najbogatiji polifenolnim spojevima, u istraživanju Woydla i sur. (2007) pokazao najslabiji antioksidacijski kapacitet. Razlog ovakvim nepodudarnostima mogu biti kao što je već prethodno navedeno razlike u geografskom podrijetlu i vanjskim faktorima uzgoja i rasta biljnih vrsta koje značajno utječu na sastav sekundarnih biljnih metabolita u biljnim vrstama.

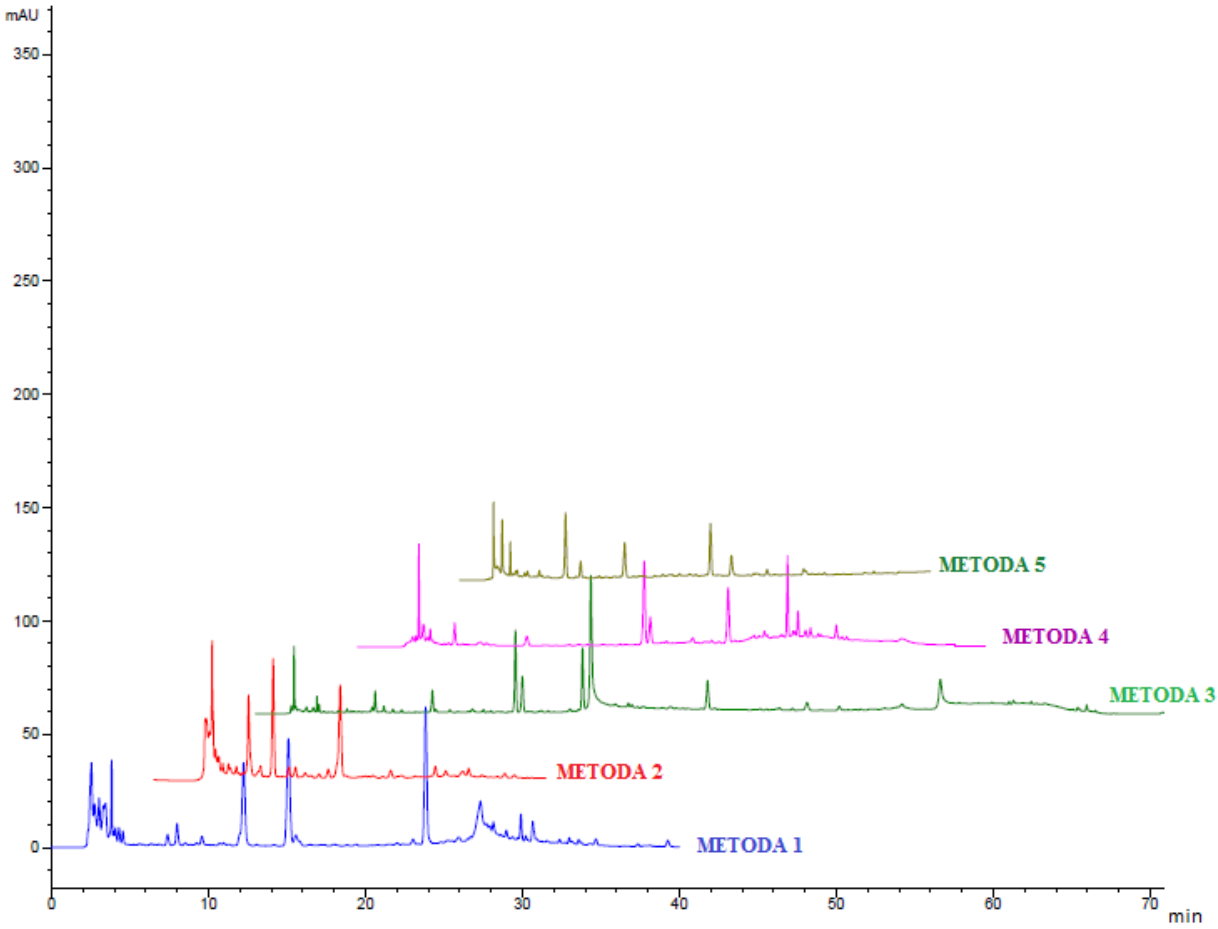
4.2. RAZVOJ UNIVERZALNE HPLC METODE ZA ANALIZU POLIFENOLNIH SPOJEVA U BILJNIM EKSTRAKTIMA

U svrhu razvoja jedinstvene HPLC metode za separaciju i kvantifikaciju velikog broja polifenolnih spojeva u različitim biljnim vrstama, korišteno je 5 već unaprijed razvijenih i primijenjenih HPLC metoda dostupnih iz literaturnih izvora. Primijenjene metode razlikovale su se prema osnovnim kromatografskim uvjetima (sastavu i gradijentu mobilne faze korištene za analizu, temperaturi kolone, duljini trajanja analize te protoku). Učinkovitost pojedine metode ocijenjena je prema sposobnosti separacije te kvantifikaciji odabranih polifenolnih spojeva (klorogenske i kafeinske kiseline, rutina i kvercetina) u istim biljnim vrstama.

Kao primjer učinkovitosti separacije prikazani su kromatogrami ekstrakta kamilice dobiveni analizom s 5 primijenjenih HPLC metoda (slika 8 i tablica 4).

Kromatografski uvjeti prema kojima je ocjenjivana efikasnost pojedine metode su brzina protoka i trajanje analize, s ciljem razvoja jedinstvene metode kratkog trajanja a iznimno dobrog razdvajanja analita iz velikog broja različitih uzoraka. Prema kromatogramima prikazanim na slici 8. vidljivo je da je dobra separacija postignuta primjenom metoda 1, 2 i 5, dok metode 3 i 4 nisu zadovoljavajuće u pogledu razdvajanja spojeva zbog preklapanja pojedinih pikova. Nadalje, metoda 2 osim izvrsnog razdvajanja karakterizirana je i vrlo kratkim trajanjem same analize, što je čini pogodnom za razvoj nove metode. U tu svrhu ta je metoda modificirana primjenom manjeg protoka (metoda 5), no, rezultati su pokazali da takav pristup ne utječe značajno ne željene odazive metode.

Osim kromatografskih prikaza učinkovitosti separacije pojedinih polifenolnih spojeva, za odabir optimalne HPLC metode poslužili su i podaci o kvantitativnim udjelima reprezentativnih polifenolnih spojeva u pojedinim biljnim vrstama. Tako se iz tablice 4 može vidjeti da su u pogledu kvantifikacije također povoljnije metode 1 i 2 koje omogućuju značajno veće udjele klorogenske i kafeinske kiseline u usporedbi s drugim metodama. Osim toga, vidljivo je da metoda 2 omogućuje kvantifikaciju flavona i flavonola, što je još jedan od uvjeta za razvoj univerzalne HPLC metode, te značajno utječe na odabir kromatografskih parametara.



Slika 8. Kromatogrami polifenolnih spojeva u ekstraktu kamilice dobiveni različitim HPLC metodama

Tablica 4. Sadržaj odabranih polifenolnih spojeva u pojedinim biljnim vrstama

	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3	Metoda 4	Metoda 5
Klorogenska kiselina					
Stolisnik	6,89	6,60	1,11	n.d.	n.d.
Kopriva	n.d.	1,05	n.d.	n.d.	n.d.
Maslačak	0,58	4,39	0,11	n.d.	n.d.
Ružmarin	n.d.	n.d.	4,89	n.d.	n.d.
Kamilica	7,03	6,36	n.d.	n.d.	n.d.
Trputac	0,28	0,97	n.d.	n.d.	n.d.
Kafeinska kiselina					
Stolisnik	0,36	1,01	1,79	0,99	tragovi
Kopriva	0,14	1,69	n.d.	n.d.	n.d.
Maslačak	1,39	1,11	4,27	n.d.	n.d.
Ružmarin	n.d.	5,38	2,20	2,68	5,88
Kamilica	6,30	1,10	0,95	0,51	0,12
Trputac	0,99	2,22	0,34	n.d.	n.d.
Kvercetin					
Stolisnik	n.d.	n.d.	tragovi	tragovi	n.d.
Kopriva	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maslačak	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ružmarin	n.d.	14,24	n.d.	n.d.	31,03
Kamilica	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trputac	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutin					
Stolisnik	n.d.	n.d.	n.d.	0,44	n.d.
Kopriva	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Maslačak	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ružmarin	n.d.	69,85	n.d.	n.d.	n.d.
Kamilica	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trputac	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nije detektirano

4.3. VALIDACIJA NOVORAZVIJENE HPLC METODE

Tablica 5. Retencijska vremena, linearnost, granice kvantifikacije (LOQ) i granice detekcije (LOD) standarda polifenolnih spojeva

Spojevi	t_R (min)*	Jednadžba pravca	R^2	Raspon koncentracija**	LOD**	LOQ**
Hidroksibenzojeve kiseline						
Galna kiselina	7,43	$y = 56{,}259x + 25{,}061$	0,9993	1-100	2,22	7,41
Protokatehinska kiselina	10,73	$y = 14{,}296x - 0{,}9936$	0,9999	0,5-100	0,38	1,27
***p*-hidroksibenzojeva kiselina**	13,90	$y = 17{,}383x + 0{,}6494$	0,9999	0,5-50	1,70	5,66
Hidroksicimetne kiseline						
Kaftarinska kiselina	11,67	$y = 11{,}209x - 2{,}0702$	0,9999	0,25-50	0,42	1,39
Klorogenska kiselina	12,70	$y = 13{,}597x - 5{,}332$	0,9981	1-100	0,93	3,10
Vanilinska kiselina	14,65	$y = 17{,}151x + 3{,}5775$	0,9999	1-100	0,78	2,60
Kafeinska kiselina	14,65	$y = 54{,}365x + 26{,}068$	0,9993	1-100	2,24	7,46
Cikorinska kiselina	16,73	$y = 15{,}025x - 4{,}3467$	0,9999	0,5-100	0,72	2,39
***p*-kumarinska kiselina**	17,34	$y = 42{,}368x - 3{,}3894$	0,9999	0,5-100	0,31	1,05
Ferulinska kiselina	17,71	$y = 25{,}653x - 0{,}3962$	0,9985	0,5-5	2,03	6,76
Siriginska kiselina	17,98	$y = 29{,}973x + 5{,}733$	0,9999	1-100	0,85	2,84
Ružmarinska kiselina	19,40	$y = 10{,}914x + 0{,}8559$	0,9997	1-100	1,88	6,26
Elaginska kiselina	20,06	$y = 3{,}5246x - 8{,}8026$	0,9983	1-100	3,98	13,24
***trans*-cimetna kiselina**	23,20	$y = 83{,}523x + 2{,}5532$	0,9999	1-100	0,77	2,56
Flavonoidi						

Luteolin -7-glukozid	18,23	$y = 11{,}101x - 4{,}5456$	0,9999	0,5-100	0,71	2,38
Kvercetin-3-*O*-glukuronid (Rutin)	18,96	$y = 15{,}561x + 5{,}258$	0,9998	1-100	1,44	4,81
Kvercetin-3- glukozid	19,18	$y = 8{,}712x - 0{,}439$	0,9985	0,5-50	2,03	6,76
Apigenin-7-glukozid	19,91	$y = 19{,}715x - 4{,}6076$	0,9999	0,5-100	0,41	1,35
Miricetin	20,51	$y = 9{,}2885x - 11{,}685$	0,9998	0,5-100	1,51	5,04
Kampferol-3-glukozid	20,70	$y = 13{,}367x - 0{,}5022$	0,9999	0,5-100	0,55	1,85
Kvercetin	22,80	$y = 28{,}715x - 10{,}716$	0,9997	1-100	1,87	6,25
Luteolin	23,62	$y = 20{,}483x - 5{,}0356$	0,9999	0,25-50	0,32	1,06
Kampferol	24,93	$y = 14{,}341x - 3{,}1341$	0,9999	0,25-50	0,51	1,71
Apigenin	25,28	$y = 24{,}287x - 12{,}57$	0,9998	0,5-100	1,19	3,96

* Retencijsko vrijeme (t_R) predstavlja srednje vrijednosti od 10 ponavljanja ± SD

** Vrijednosti izražene u µg/mL

Preliminarni eksperimenti provedeni su u svrhu razvoja brze metode koja će omogućiti dobivanje najbolje razlučivosti pikova te razdvajanje različitih spojeva koji pripadaju skupini polifenolnih spojeva. Prilagođavajući tehnike prethodno razvijene i dostupne u znanstvenim literaturnim izvorima (Wang i sur., 2004; Wen i sur., 2005; Fecka i Turek, 2008; Durling i sur., 2007; Belščak-Cvitanović i sur., 2012), metoda je razvijena analizom nekoliko pravih uzoraka (biljnih ekstrakata) i određivanjem reprezentativnih polifenolnih spojeva u tim ekstraktima. Razvijenom HPLC metodom omogućeno je razdvajanje 24 glavnih polifenolnih spojeva. Optimizacijom kromatografskih uvjeta omogućeno je istovremeno učinkovito razdvajanje 3 hidroksibenzojevih kiselina, 11 hidroksicimetnih kiselina te 10 slobodnih ili glikoziliranih flavonoida iz standardnih smjesa.

HPLC metoda validirana je definiranjem linearnosti, granica detekcija i kvantifikacije svih 24 polifenolnih spojeva, dok su za polifenole koji su najzastupljeniji u ispitivanim biljnim vrstama određeni parametri validacije točnost i preciznost. Za kvalitativne potrebe, metoda je procijenjena uzimajući u obzir preciznost unutar vremena zadržavanja, koja je vrlo ponovljiva s RSD vrijednošću manjom ili jednakom 1% za procijenjene standarde.

Kalibracijske krivulje za kvantifikaciju hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina te flavonoida ovisnosti površine pika (mAU) o koncentraciji(μg/mL) prethodno pripremljenih otopina standarda prikazane su u tablici 5. Linearne kalibracijske krivulje konstruirane su unutar raspona 0,5-100 μg/mL za hidroksibenzojeve kiseline, 0,25-100 μg/mL za hidroksicimetne kiseline. te 0,25-100 μg/mL za flavonoide. Na temelju kalibracijskih krivulja dobiju se jednadžbe pravca koje su dobre linearnosti što potvrđuju vrijednosti korelacijskog faktora (R^2) koje se kreću od 0,9981 do 0,9999 te su prikazane u tablici 5.

U tablici 5 navedene su vrijednosti vremena zadržavanja odnosno retencijskog vremena za sve standardne spojeve. Vrijeme zadržavanja hidroksibenzojevih kiselina kreće se u rasponu 7,43-13,90 minuta. Hidroksicimetne kiseline se duže zadržavaju unutar kolone, u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline čemu svjedoče i veće vrijednosti retencijskih vremena što najviše ovisi o prirodi spoja koji se analizira te o sastavu mobilne faze. Najviše vremena od injektiranja do izlaska pika analita s kolone i detektiranja pika na detektoru je potrebno flavonoidnim spojevima pa je tako apigeninu potrebno čak 25,28 minuta.

Također su određene granice detekcije i kvantifikacije standardnih spojeva čije su vrijednosti prikazane u tablici 4. Vrijednosti LOD i LOQ, koje se kreću unutar raspona 0,31-3,98 µg/mL i 1,05-13,24 µg/mL, pokazuju visoku sposobnost i prikladnost metode za kvantifikaciju svakog ispitivanog fenolnog spoja. Najveća LOD i LOQ vrijednost, znatno viša od vrijednosti dobivenih za fenolne spojeve, određena je za elaginsku kiselinu.

Tablica 6. Parametri točnosti i preciznosti pet polifenolnih spojeva dobiveni primjenom novorazvijene HPLC metode

Spojevi	**Dodana koncentracija (*µg/mL*)**	**Točnost (*%, n=3*)**	**Preciznost* (*n=10*)**
Klorogenska kiselina	5	100,06	0,22
	25	98,22	
	50	96,68	
Kafeinska kiselina	5	96,13	0,24
	25	100,49	
	50	98,98	
Ružmarinska kiselina	5	99,69	1,01
	25	95,14	
	50	97,64	
Luteolin	5	98,45	0,18
	25	100,26	
	50	99,17	
Apigenin	5	97,15	0,13
	25	95,68	
	50	98,47	

*RSD od 10 ponavljanja injektiranja koncentracije od 50 µg/mL

U tablici 6 prikazane su vrijednosti točnosti i preciznosti za pet polifenolna spoja koji su u ovom radu korišteni kao biomarkeri pojedinih biljnih vrsta. Točnost metode određena je analizom otopina klorogenske, kafeinske i ružmarinske kiseline te luteolina i apigenina poznatih koncentracija na tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode. Za svaku koncentraciju izvršena su tri mjerenja. Visoke vrijednosti točnosti (> 96%) i ponovljivosti pokazuju zadovoljavajuću točnost razvijene HPLC metode. Točnost je bila nezavisna od oba tipa polifenolnih spojeva (kemijskoj strukturi spoja) i koncentraciji. Kako bi se odredila preciznost provedeno je deset mjerenja koncentracije spojeva od 50 μg/mL te je preciznost izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD) između mjerenja. Preciznost injektiranja na ispitivanim standardima izložena je RSD vrijednosti manjoj od 1.

4.4. KVANTITATIVNI SASTAV ISPITIVANIH BILJNIH EKSTRAKATA ODREĐEN PRIMJENOM NOVORAZVIJENE HPLC METODE

Tablica 7. HPLC profil fenolnih kiselina (mg/L) u ispitivanim ljekovitim biljnim vrstama

	Fenolne kiseline								
	GK	***PkK***	***KloK***	***KaftK***	***KafK***	***RužK***	***p-kumK***	***HckD***	***ΣHck***
					Lamiaceae				
Matičnjak	n.d.	n.d.	7,03	17,21	3,69	661,37	n.d.	249,29	938,59
Paprena metvica[a]	n.d.	n.d.	n.d.	8,14	10,63	670,47	n.d.	13,1	702,34
Kadulja	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,66	201,65	n.d.	n.d.	204,31
Lavanda	n.d.	n.d.	204,18	28,99	n.d.	225,55	n.d.	n.d.	458,72
Timijan	n.d.	n.d.	13,55	n.d.	n.d.	280,66	n.d.	15,54	309,75
Ružmarin	n.d.	n.d.	10,02	11,23	8,56	613,34	n.d.	n.d.	643,15
					Asteraceae				
Maslačak[b]	n.d.	6,55	26,5	144,55	10,31	n.d.	n.d.	14,06	488,27
Neven	n.d.	n.d.	21,09	6,68	1,77	n.d.	n.d.	61,68	91,22
Kamilica	5,76	36,75	161,4	n.d.	n.d.	n.d.	84,01	376,02	621,43
Stolisnik[c]	n.d.	n.d.	148,64	n.d.	12,81	n.d.	20,14	229,16	437,81
					Ostalo				
Gospina trava	n.d.	n.d.	40,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	48,57	89,08
Lipa	2,08	23,97	7,54	8,23	n.d.	n.d.	n.d.	9,32	25,09
List masline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51,92	51,92
Preslica[d]	n.d.	n.d.	n.d.	27,07	< LOQ	n.d.	n.d.	133,04	191,64
Kopriva	n.d.	n.d.	8,26	12,36	n.d.	n.d.	n.d.	47,77	68,39
Trputac	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	391,39	391,39

a – udjel *p*-hidroksibenzojeve kiseline 36,29 mg/L
b – udjel cikorinske kiseline 292,85 mg/L
c – udjel ferulinske kiseline 27,06 mg/L; sadržaj Σ rutin D 104,15 mg/L

d – udjel elaginske kiseline 31,53 mg/L
Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti.
Standardna devijacija svih mjerenja iznosila je <10%.
n.d.= nije detektirano.

Popis kratica:

GK – galna kiselina

PkK – protokatehinska kiselina

KloK – klorogenska kiselina

KaftK – kaftarinska kiselina

KafK – kafeinska kiselina

RužK – ružmarinska kiselina

p-kumK – *p*-kumarinska kiselina

HckD - derivati hidroksicimetnih kiselina

ΣHck – suma hidroksicimetnih kiselina

Rezultati identificiranih fenolnih kiselina u ispitivanim biljnim ekstraktima pomoću novorazvijene HPLC metode prikazani su u tablici 7 i izraženi su kao mg/L.

Iz tablice 7 vidljivo je kako u biljnim vrstama iz porodice *Lamiaceae* nisu identificirane hidroksibenzojeve kiseline. Iznimka je ekstrakt paprene metvice u kojem je identificirana *p*-hidroksibenzojeva kiselina čija koncentracija u ispitivanom ekstraktu iznosi 36,29 mg/L. Unutar porodice *Asteraceae*, biljne vrste koje sadrže hidroksibenzojeve kiseline su maslačak i kamilica. U ekstraktu maslačka identificirana je protokatehinska kiselina u koncentraciji od 6,55 mg/L, dok je u ekstraktu kamilice uz protokatehinsku kiselinu (36,75 mg/L) prisutna i galna kiselina (5,76 mg/L). Lipa je jedina biljna vrsta u kojoj su identificirane hidroksibenzojeve kiseline, a koja ne pripada prethodno navedenim porodicama. U ekstraktu lipe prisutna je galna kiselina (2,08 mg/L) i protokatehinska kiselina čija je koncentracija 11,52 puta veća od galne kiseline (23,97 mg/L).

U ispitivanim biljnim vrstama dominiraju hidroksicimetne kiseline od kojih su identificirane klorogenska, kaftarinska, kafeinska, ružmarinska i *p*-kumarinska kiselina te derivati hidroksicimetnih kiselina.

Koncentracija identificiranih hidroksicimetnih kiselina u biljnim vrstama unutar porodice *Lamiaceae* značajno variva. *p*-kumarinska kiselina je jedina hidroksicimetna kiselina koja nije identificirana u ispitivanim biljnim vrstama unutar navedene porodice, dok je u istraživanju koje su proveli Sytar i suradnici (2016) navedena kiselina identificirana u značajnoj količini u ekstraktu lavande (3543 ± 0,067 mg/L). U ekstraktima matičnjaka, paprene metvice i ružmarina prevladava ružmarinska kiselina čija je koncentracija u navedenim ekstraktima veća od 600 mg/L, dok su ostale hidroksicimetne kiseline prisutne u maloj količini. Visok udjel ružmarinske kiseline u ekstraktu matičnjaka potvrđuje i istraživanje koje su proveli Arceusz i Wesolowski (2013) čije se vrijednosti kreću u rasponu 158-48608 mg/L. Arceusz i Wesolowski (2013) navode kako su razlike udjela ružmarinske kiseline u ispitivanim uzorcima matičnjaka opravdane budući da su za analizu korišteni različiti biljni materijali spomenute biljne vrste. Uspoređivanjem vrijednosti dobivenih u ovom radu i vrijednosti iz prethodno spomenute literature primijećene su značajne razlike koje su posljedica geografskih i klimatskih faktora te različitih uvjeta provedbe HPLC metode odnosno otapala korištenih za analizu. Među hidroksicimetnim kiselinama, ružmarinska kiselina kao ester kafeinske kiseline, je najzastupljenija fenolna kiselina u biljnim vrstama iz porodice *Lamiaceae* te se često koristi kao kemotaksonomski marker za tu biljnu

porodicu (Kivilompolo i sur., 2007). Značajniji udjel klorogenske kiseline prisutan je u ekstraktu lavande (204,18 mg/L). Kaftarinska kiselina nije detektirana u ekstraktu kadulje i timijana, a kafeinska kiselina u ekstraktu lavande i timijana, koja je identificirana u ekstraktu timijana u istraživanju koje su proveli Fecka i Turek (2008) te je uz kafeinsku kiselinu identificirana i ružmarinska kiselina. Dobivena vrijednost udjela ružmarinske kiseline (280,66 mg/L) u ovome radu značajno je manja od vrijednosti (11040-35310 mg/L) koje su dobili Fecka i Turek (2008) te navode kako je udjel ružmarinske kiseline u ispitivanim vrstama *Lamiaceae* usporediv s rezultatima drugih istraživača (Dorman i sur., 2004; Kosar i sur., 2005; Parejo i sur., 2004; Wang i sur., 2004). Primijećene razlike u udjelu ružmarinske kiseline vjerojatno su posljedica različitih uvjeta provedbe HPLC metode te ekstrakcije ciljanih analita.

Najviše derivata hidroksicimetnih kiselina prisutno je u ekstraktu matičnjaka (249,29 mg/L), a nisu detektirani u ekstraktima kadulje, lavande i ružmarina. Nakon provedene HPLC analize utvrđeno je kako je najviše hidroksicimetnih kiselina prisutno u ekstraktu matičnjaka (938,59 mg/L), a najmanje u ekstraktu kadulje (204,31 mg/L). Prema navedenim rezultatima može se definirati sljedeći opadajući niz ispitivanih ekstrakata: matičnjak > paprena metvica > ružmarin > lavanda > timijan > kadulja. Usporedbom rezultata o udjelu hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim biljnim ekstraktima dobivenim nakon provedene spektrofotometrijske i HPLC analize može se zaključiti kako je spektrofotometrijskom analizom utvrđena 2,4-4,8 puta veća koncentracija ovisno o biljnoj vrsti, nego HPLC analizom iako je dobiveni niz biljnih vrsta gotovo jednak nizu udjela (određenog spektrofotometrijski) hidroksicimetnih kiselina. Razlog tome je puno manja selektivnost Folin-Ciocalteau reagensa za spektrofotometrijsko određivanje udjela ukupnih polifenola, koji osim polifenolnih spojeva reagira i s drugim bioaktivnim spojevima u biljnim ekstraktima te zato daje znatno veće kvantitativne podatke o udjelima polifenola.

Udjel hidroksicimetnih kiselina u biljnim vrstama unutar porodice *Asteraceae* značajno variva. Ekstrakt maslačka karakterizira visok sadržaj cikorinske kiseline čija koncentracija iznosi 292,85 mg/L. što je značajno manje u odnosu na dobivenu vrijednost (31480 mg/L) u istraživanju koje je proveo Ivanov (2014). Uz cikorinsku kiselinu u ekstraktu maslačka dominira kaftarinska kiselina (144,55 mg/L), dok su klorogenska, kava kiselina i derivati hidroksicimetnih kiselina prisutni u malim udjelima. U ekstraktu kamilice i stolisnika dominiraju klorogenska kiselina (161,4 mg/L; 148,64 mg/L) i derivati hidroksicimetnih kiselina (376,02 mg/L; 229,16 mg/L), dok kaftarinska

kiselina nije detektirana. U ekstraktu stolisnika još je identificirana ferulinska kiselina čija koncentracija iznosi 27,06 mg/L, što je gotovo 13 puta manje u odnosu na dobivenu vrijednost (350 mg/L) u istraživanju kojeg su proveli Wojdyła i suradnici (2007). *p*-kumarinska kiselina detektirana je u većem udjelu u ekstraktu kamilice (84,01 mg/L), dok je u ekstraktu stolisnika uočena i do 4 puta manji udjel navedene kiseline. Ružmarinska kiselina nije detektirana ni u jednom biljnoj vrsti iz navedene porodice. Udjel hidroksicimetnih kiselina u biljnim ekstraktima nakon provedene spektrofotometrijske i HPLC analize značajno varira. Nakon provedene HPLC analize, najveći udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u ekstraktu kamilice što je 2,75 puta više u odnosu na rezultate spektrofotometrijske analize, dok je u ekstraktu maslačka i nevena taj udjel 4,65 odnosno 6,6 puta manji. U ekstraktu stolisnika nema značajnih razlika u udjelu hidroksicimetnih kiselina nakon provedenih analiza.

U biljnim vrstama koje ne pripadaju porodici *Lamiaceae* i *Asteraceae*, nakon provedene HPLC analize, nisu identificirane kafeinska, ružmarinska i *p*-kumarinska kiselina. Najveći udjel klorogenske kiseline prisutan je u ekstraktu gospine trave (40,51 mg/L) što je 5,4 odnosno 4,9 puta više u odnosu na ekstrakt lipe i koprive (7,54 mg/L; 8,26 mg/L). Zastupljenost kaftarinske kiseline dominira u ekstraktu preslice (27,07 mg/L), a slijede je ekstrakt koprive i lipe. Uz kaftarinsku kiselinu u ekstraktu preslice identificirana je elaginska kiselina (31,53 mg/L). U svim biljnim vrstama, koje ne pripadaju navedenim porodicama, identificirani su derivati hidroksicimetnih kiselina koji prevladaju u ekstraktu trputca (391,39 mg/L) i preslice (133,04 mg/L). Nakon provedene HPLC analize, najveći udjel hidroksicimetnih kiselina određen je u ekstraktu stolisnika (391,39 mg/L) što je 1,4 puta više u odnosu na rezultate spektrofotometrijske analize. U ekstraktima ostalih biljnih vrsta, udjel hidroksicimetnih kiselina je značajno manji u odnosu na rezultate dobivene spektrofotometrijskom analizom.

Tablica 8. HPLC profil flavonoida (mg/L) u ispitivanim biljnim vrstama

	Flavoni i flavonoli				
	L-7-G	**Σ Lut D**	**Σ Apig D**	**Σ Kverc D**	**Σ Flavonoidi**
			Lamiaceae		
Matičnjak	n.d.	n.d.	11,59	n.d.	11,59
Paprena metvica	97,41	56,54	n.d.	n.d.	153,95
Kadulja	230,66	40,68	n.d.	n.d.	271,34
Lavanda	100,08	64,13	n.d.	n.d.	164,21
Timijan	122,3	9,33	n.d.	n.d.	131,63
Ružmarin	n.d.	n.d.	142,38	196,82	339,2
			Asteraceae		
Maslačak	n.d.	n.d.	n.d.	87,19	87,19
Neven	n.d.	n.d.	23,85	n.d.	23,85
Kamilica	80,69	n.d.	31,98	n.d.	112,67
Stolisnik	n.d.	70,09	34,06	n.d.	104,15
			Ostalo		
Gospina trava	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Lipa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
List masline	35,61	n.d.	21,21	n.d.	56,82
Preslica	n.d.	n.d.	n.d.	17,68	17,68
Kopriva	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trputac	47,34	n.d.	59,70	n.d.	107,04

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti.
Standardna devijacija svih mjerenja iznosila je <10%.
n.d.= nije detektirano

Popis kratica:

L-7-G – luteolin-7-glukozid
Σ Lut D – suma derivata luteolina
Σ Apig D – suma derivata apigenina
Σ Kverc D – suma derivata kvercetina

.

Rezultati identificiranih flavona i flavonoida u ispitivanim biljnim ekstraktima pomoću novorazvijene HPLC metode prikazani su u tablici 8 i izraženi su kao mg/L. Iz tablice 8, vidljivo je kako su dobiveni rezultati za derivate luteolina, apigenina i kvercetina izraženi kao suma svih identificiranih derivata navedenih spojeva.

Unutar porodice *Lamiaceae*, derivati kvercetina identificirani su samo u ekstraktu ružmarina (196,82 mg/L), dok su derivati apigenina identificirani u ekstraktu ružmarina i matičnjaka. U istraživanju koje su proveli Generalić-Mekinić i suradnici (2014) identificiran je značajan udjel apigenina u ekstraktu timijana (420 mg/L). Luteolin-7-glukozid i derivati luteolina nisu prisutni u ekstraktu ružmarina i matičnjaka. Iako je koncentracija luteolin-7-glukozida u ekstraktu paprene metvice, lavande i timijana visoka (97,41 mg/L; 100,08 mg/L; 122,3 mg/L), najviše ga je prisutno u ekstraktu kadulje (230,66 mg/L) što je manje u odnosu na vrijednost (496 mg/L) dobivenu u istraživanju Wojdyła i suradnika (2007). Uočene razlike između dobivenih vrijednost posljedica su različitih uvjeta provedbe HPLC metode. Najmanja koncentracija derivata luteolina određena je u ekstraktu timijana (9,33 mg/L) što je 6,9 puta manje u odnosu na ekstrakt lavande (64,13 mg/L). Najviše flavonoida je prisutno u ekstraktu ružmarina (339,2 mg/L), a slijede ga ekstrakt kadulje, lavande i paprene metvice. Najmanje flavonoida identificirano je u ekstraktu matičnjaka (11,59 mg/L).
Usporedbom rezultata dobivenih nakon spektrofotometrijske i HPLC analize, može se zaključiti da je HPLC analizom u ekstraktu ružmarina, lavande i kadulje određen veći udjel flavonoida. U ekstraktu matičnjaka određen je čak 7,6 puta manji udjel flavonoida. Značajna razlika u udjelu flavonoida jedino nije zabilježena kod ekstrakta timijana.

Prema dobivenim rezultatima o sadržaju flavona i flavonola nakon HPLC analize u biljnim vrstama koje pripadaju porodici *Asteraceae*, uočeno je kako derivati luteolina nisu identificirani u ispitivanim biljnim ekstraktima. Derivati apigenina identificirani su u ekstraktu nevena (23,85 mg/L) te u nešto većoj koncentraciji u ekstraktu kamilice (31,98 mg/L). Luteolin-7-glikozid jedino je identificiran u ekstraktu kamilice, dok su derivati kvercetina prisutni samo u ekstraktu maslačka. U ekstraktu stolisnika dominiraju samo derivati rutina (104,5 mg/L) što je više u odnosu na vrijednost (95,21 mg/L) za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima odnosno manje u odnosu na vrijednost (128,97 mg/L) za ekstrakciju dekokcijom kako je dobiveno u radu Georgieve i suradnika (2015). Na primijećene razlike u vrijednostima sigurno je utjecao sam

način provedbe ekstrakcije te se može zaključiti kako je ekstrakcija dekokcijom bolji postupak za separaciju većeg udjela rutina u ispitivanom ekstraktu stolisnika. Najveći udjel flavonoida određen je u ekstraktu kamilice (112,67 mg/L) što je sukladno rezultatu dobivenom nakon spektrofotometrijske analize, a najmanji u ekstraktu nevena (23,85 mg/L).
Uspoređujući rezultate spektrofotometrijske i HPLC analize, vidljivo je kako je HPLC analizom jedino u ekstraktu stolisnika određen veći udjel flavonoida. Rezultati udjela flavonoida spektrofotometrijske analize za ostale biljne ekstrakte su veći od onih dobivenim HPLC analizom.

HPLC analizom ekstrakata biljnih vrsta koje ne pripadaju prethodno spomenutim porodicama utvrđena je vrlo mala koncentracija flavona i flavonola. Navedeni spojevi nisu identificirani u ekstraktu gospine trave, lipe i koprive. Derivati kvercetina identificirani su samo u ekstraktu preslice (17,68 mg/L), dok je kvercetin u istraživanju Wojdyła i suradnika (2007) identificiran u ekstraktu gospine trave u značajnijem udjelu (497 mg/L). Derivati apigenina identificirani su u ekstraktu trputca i lista masline. Iako je luteolin-7-glikozid identificiran u ekstraktu lista masline i trputca, njegova koncentracija je ipak veća u ekstraktu trputca (47,34 mg/L).
Za razliku od rezultata dobivenih spektrofotometrijskom analizom, u ekstraktu trputca je HPLC analizom utvrđen i do 2,3 puta veći udjel flavonoida. Rezultati za udjel flavonoida u ekstraktu lista masline i preslice su manji u odnosu na rezultate dobivene spektrofotometrijskom analizom.

5. ZAKLJUČCI

1. Među ispitivanim biljnim ekstraktima najveći udjel ukupnih polifenola određen je u biljnim vrstama iz porodice *Lamiaceae* (matičnjak, paprena metvica) zatim *Asteraceae* (maslačak), nakon čega slijede ostale biljne vrste.

2. Biljne vrste iz porodice *Lamiaceae* karakterizira visok udjel hidroksicimetnih kiselina, ali i flavona te flavonola.

3. Usporedba vrijednosti linearnih korelacija uspostavljenih između udjela određenih podskupina polifenola i antioksidacijskog kapaciteta ukazuje da je podskupina hidroksicimetnih kiselina zastupljenija u biljnim vrstama te više doprinosi njihovim antioksidacijskim svojstvima od podskupine flavona i flavonola.

4. Razvijena je HPLC metoda kojom je omogućeno razdvajanje 24 polifenolnih spojeva u kratkom vremenu (30 min) u različitim biljnim vrstama.

5. Novorazvijenom HPLC metodom omogućeno je razdvajanje različitih podskupina polifenolnih spojeva i to 3 hidroksibenzojeve kiseline, 11 hidroksicimetnih kiselina te 10 slobodnih ili glikoziliranih flavonoida.

6. Vrijednosti granice detekcije i kvantifikacije te visoke vrijednosti parametara preciznosti i točnosti dokazuju prikladnost razvijene HPLC metode za kvantifikaciju polifenolnih spojeva u ekstraktima biljnih vrsta.

7. Od hidroksibenzojevih kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina identificirana je u ekstraktu paprene metvice, galna u ekstraktu kamilice i lipe, dok je protokatehinska kiselina identificirana u ekstraktu maslačka, kamilice i lipe.

8. Od hidroksicimetnih kiselina najzastupljenije su ružmarinska, klorogenska te kafeinska kiselina, i to u ekstraktima biljaka iz porodice *Lamiaceae* (matičnjak, paprena metvica i ružmarin).

9. Prisutnost određenog polifenolnog spoja u samo jednoj biljnoj vrsti, kao što su cikorinska kiselina u maslačku, *p*-hidroksibenzojeva kiselina u paprenoj metvici, ferulinska kiselina u stolisniku te elaginska kiselina u preslici mogu se smatrati biomarkerima tih biljnih vrsta.

10. Iz skupine flavona i flavonola, karakteristična je prisutnost većeg udjela luteolin-7-glukozida u ekstraktima kadulje i kamilice, dok su u ekstraktu stolisnika dominantni derivati rutina.

6. LITERATURA

Abad-García, B., Berrueta, L.A., López-Márquez, D.M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B., Vicente, F. (2007) Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *J. Chromatogr. A* **1154**, 87-96.

AOAC (1995) Official Methods of Analysis of AOAC International, 16. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Arceusz, A., Wesolowski, M. (2013) Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *J. Pharmaceut. Biomed.* **83**, 215-220.

Atanassova, M., Georgieva, S. (2010) Comparative polyphenol composition and antioxidant capacity of the Bulgarian plants (dry herbs). *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **9**, 1514-1523.

Bhardwaj, S.K., Dwivedi, K., Agarwal, D.D. (2015) A Review: HPLC Method Development and Validation. *Int. J. Anal. Bioanal. Chem.* **5**, 76-81.

Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., Bauman, I. (2012) Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Res. Int.* **48**, 820-830.

Chang, C.C., Yang, H.M., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **10**, 178-182.

Chikezie, P.C., Ibegbulem, C.O., Mbagwu, F.N. (2015) Bioactive Principles from Medicinal Plants. *Res. J. Phytochemistry* **9**, 88-115.

Deepa, V.S., Kumar, P.S., Latha, S., Selvamani, P., Srinivasan, S. (2009) Antioxidant studies on the ethanolic extract *of Commiphora* spp., *Afr. J. Biotechnol.* **8**, 1630-1636.

Dorman, H. J. D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. (2004) Antioxidant properties of aq. extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 762-770.

Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., Perry, N.B. (2007) Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chem.* **101**, 1417-1424.

Ermer, J. (2005) Performance Parameters, Calculations and Tests. U: Method Validation in Pharmaceutical Analysis (Ermer, J., Miller, J.H., ured.), Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 21-194.

Escarpa, A., González, M.C. (2001) Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta* **427**, 119-127.

Fecka, I., Turek, S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.* **108**, 1039-1053.

Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V. (2014) *In vitro* Antioxidant and Antibacterial Activity of Lamiaceae Phenolic Extracts: A Correlation Study. *Food Technol. Biotech.* **52**, 119-127.

Georgieva, L., Gadjalova, A., Mihaylova, D., Pavlov, A. (2015) *Achillea millefolium* L. – phytochemical profile and *in vitro* antioxidant activity. *Int. Food Res. J.* **22**, 1347-1352.

Gupta, V., Jain, A.D.K., Gill, N.S., Gupta, K. (2012) Development and validation of HPLC method - a review. *Int. Res. J. Pharm. App. Sci.* **2**, 17-25.

Havesteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1141-1148.

Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N., Kerry, J.P. (2011) Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem.* **126**, 948-955.

Hostettmann, K., Wolfender, J.-L. (2001) Applications of Liquid Chromatography/UV/MS and Liquid Chromatography/NMR for the On-line Identification of Plant Metabolites. U: Bioactive Compounds from Natural Sources Isolation, characterisation and biological properties (Tringali, C., ured.), Taylor & Francis, London/New York, str. 31-68.

Ivanov, G.I. (2014) Polyphenols Content and Antioxidant Activities of *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (Dandelion) Leaves. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **6**, 889-893.

Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005) Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **96**, 145-150.

Katalinić, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **94**, 550-557.

Kivilompolo, M., Hyötyläinen, T. (2007) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of *Lamiaceae* herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J. Chromatogr. A* **1145**, 115-164.

Kosar, M., Dorman, H. J. D., Hiltunen, R. (2005) Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.* **91**, 525-533.

Kuštrak, D., (2005) Farmakognozija – fitofarmacija, Golden marketing, Tehnička knjiga, Zagreb.

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri*, 61-64, <http://www.akreditacija.hr/casopis>. Pristupljeno 22. svibnja 2016.

Li, W., Qu, H. (2010) Rapid quantification of phenolic acids in Radix *Salvia miltiorrhiza* extract solutions by FT-NIR spectroscopy in transflective mode. *J. Pharmaceut. Biomed.* **52**, 425-431.

Liang, Y., Peishan, X., Chan, K. (2004) Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B* **812**, 53-70.

Liaudanskas, M., Viškelis, P., Jakštas, V., Raudonis, R., Kviklys, D., Milašius, A., Janulis, V. (2014) Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. *J. Chem.* **2014**, 1-10.

Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P., Sharma, P.K. (2010) High Perfomance Liquid Chromatography: A Short Review. *J. Global Pharm.Technol.* **2**, 22-26.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.

Matkowski, A. (2008) Antioxidant Activity of Extracts and Different Solvent Fractions of *Glechoma hederacea* L. and *Orthosiphon stamineus* (Benth.) Kudo. *Adv. Clin. Exp. Med.* **17**, 6, 615-624.

Neri, P., Tringali, C. (2001) Applications of Modern NMR Techniques in the Structural Elucidation of Bioactive Natural Products. U: Bioactive Compounds from Natural Sources Isolation, characterisation and biological properties (Tringali, C., ured.), Taylor & Francis, London/New York, str. 69-127.

Nesek, B. (2004) Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni. <https://bib.irb.hr/datoteka/185110.Diplomski_rad.pdf>. Pristupljeno 24. travnja. 2016.

Nigović B., Jurišić Grubišić R., Vuković J. (2007) Praktikum iz analitike lijekova II.dio. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko- biokemijski fakultet. Zagreb, str. 30-33.

Nutraingredients (2012) Chemometrics, The Benchmark for Quality Control of Herbal Extracts. <http://www.nutraingredients.com/Product-innovations/Chemometrics-The-Benchmark-for-Quality-Control-of-Herbal-Extracts>. Pristupljeno 6. srpnja 2016.

Olkowski, A.A., Amarowicz, R., Peiquiang, Yu., McKinnon, J.J., Maenz D.D. (2003) A rapid HPLC method for determination of major phenolic acids in plant material. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **12**, 53-57.

Oniszczuk, A., Podgórski, R., Oniszczuk, T., Zukiewicz-Sobczak, W., Nowak, R., Waksmundzka-Hajnos, M. (2014) Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. *Ind. Crop. Prod.* **61**, 377-381.

Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *Sci. World J.* **2012**, 1-12.

Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley & Sons, New York.

Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Jáuregui, O., Codina, C. (2004) Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J. Ethnopharmacol.* **94**, 175-184.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2004) Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Anal. Chim. Acta* **512**, 271-280.

Pellati, F., Benvenuti, S., Melegari, M. (2005) Chromatographic performance of a new polar poly(ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. *J. Chromatogr. A* **1088**, 205-217.

Porter, L.J., Hrstich, L., Chan, B.G. (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* **25**, 223-230.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231-1237.

Rodriguez, M.V., Martínez, M.L., Cortadi, A., Campagna, M.N., Di Sapio, O., Derita, M., Zacchino, S., Gattuso, M. (2012) Quality Control of Herbal Medicines with Spectrophotometry and Chemometric Techniques – Application to *Baccharis* L. Species Belonging to Sect – Caulopterae DC. (*Asteraceae*). U: J. Uddin (Eds.), Macro To Nano Spectroscopy, str. 399-420.

Sabir, A.M., Moloy, M., Parminder, B.S. (2013) HPLC method development and validation: a review. *Int. Res. J. Pharm.* **4**, 39-46.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R.M. (1999a) Flavanoids and other polyphenols. *Method. Enzymol.* **299**, 152.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamela-Raventós, R.M. (1999b) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteau reagent. *Method. Enzymol.* **299**, 1179.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.

Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., Brestic, M. (2016) Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi J. Biol. Sci.* (objavljeno online 26. siječnja 2016.). doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.036

Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Sullivan, D.R., Fenech, M., Patch, C.S., Roodenrys, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M., Williams, P.G., Fazio, V.A., Inge, K.E. (2006) Health benefits of herbs and spices: The past, the present, the future. *Med. J. Aust.* **185**, 1-24.

Tsao, R., Yang R. (2003) Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1018**, 29-40.

Vagiri, M., Ekholm, A., Andersson, S.C., Johansson, E., Rumpunen, K. (2012) An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agr. Food Chem.* **60**, 10501-10510.

Wang, H., Provan, G. J., Helliwell, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* **87**, 307-311.

Wen, D., Li, C., Di, H., Liao, Y., Liu, H. (2005) A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 6624-6629.

WHO (1998) Quality control methods for medicinal plant materials, WHO – World Health Organization, Geneva.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* **105**, 940-949.