

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz timijana (*Thymus vulgaris*), kadulje (*Salvia officinalis*) i lovora (*Lurus nobilis*) primjenom ultrazvuka

Renko, Ira

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:075177>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ira Renko

7337/PT

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ TIMIJANA (*Thymus vulgaris*), KADULJE
(*Salvia officinalis*) I LOVORA (*Laurus nobilis*) PRIMJENOM ULTRAZVUKA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno istraživačkog projekta:

Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ – KK.01.1.1.04.0093, koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020

Mentor: *doc. dr. sc. Sandra Pedisić*

Zagreb, rujan 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ TIMIJANA (*Thymus vulgaris*), KADULJE (*Salvia officinalis*) I LOVORA (*Lurus nobilis*) PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Ira Renko 0058209153

Sažetak: Timijan, lovor i kadulja su aromatske biljke intenzivnog mirisa koje se zbog svojih ljekovitih svojstava i arome koriste u kulinarstvu, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Cilj ovog rada bio je izolirati bioaktivne spojeve iz navedenih biljaka uzastopnom ekstrakcijom s tri različita otapala (heksan, 80% aceton i 96% etanol) u ultrazvučnoj kupelji pri 65°C u trajanju od 30 minuta. Maseni udio fenolnih spojeva (ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, flavonoidi), karotenoida i klorofila je određen spektrofotometrijskim metodama, dok je antioksidativni kapacitet u acetonskim i etanolnim ekstraktima određen primjenom kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC). Najveći maseni udio fenolnih spojeva određen je u ekstraktima kadulje dobivenim ekstrakcijom sa 80% acetonom gdje je određen i najveći antioksidativni kapacitet ORAC metodom dok najveći maseni udio ukupnih karotenoida i klorofila sadrže ekstrakti lista lovora.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, aromatsko bilje, fenolni spojevi, karotenoidi, klorofili

Rad sadrži: 35 stranica, 13 slika, 1 tablica, 70 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000, Zagreb

Mentor: doc. dr.sc. Sandra Pedisić

Pomoć pri izradi: Patricija Lisica mag. ing.

Rad predan: 15. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ULTRASOUND EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THYME (*Thymus vulgaris*),
SAGE (*Salvia officinalis*) AND LAUREL (*Laurus nobilis*)

Ira Renko 0058209153

Abstract Thyme, laurel and sage are aromatic plants with an intense aroma used in the culinary, food and pharmaceutical industries due to their medicinal properties and aroma. The aim of this study was to isolate bioactive compounds from these plants by successive extraction with three different solvents (hexane, 80% acetone and 96% ethanol) in an ultrasonic bath at 65 ° C for 30 minutes. The mass fraction of phenolic compounds (total phenols, hydroxycinnamic acids, flavonols, flavonoids), carotenoids and chlorophylls was determined by spectrophotometric methods, while the antioxidant capacity in acetone and ethanol extracts was determined using oxygen radical absorption capacity (ORAC) method. The highest mass fraction of phenolic compounds was determined in sage extracts obtained by extraction with 80% acetone, where the highest antioxidant capacity was determined by the ORAC method. The results showed that the largest mass fraction of total carotenoids and chlorophylls is contained in bay leaf extracts.

Keywords: antioxidative capacity, aromatic plants, carotenoids, chlorophylls, phenolic compounds

Thesis contains: 35 pages, 13 figures, 1 table, 70 references, 0 supplement

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. *Sandra Pedisić*, Assistant professor

Technical support and assistance: *Patricija Lisica*, BSc Research Assistant

Defence date: September 15th 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kemijski sastav selektiranih biljnih vrsta: timijana, kadulje i lovora	2
2.1.1. Timijan (<i>lat. Thymus vulgaris L.</i>)	2
2.1.2. Kadulja (<i>lat. Salvia officinalis L.</i>)	3
2.1.3. Lovor (<i>lat. Laurus nobilis L.</i>)	3
2.2. Eterična ulja selektiranih biljnih vrsta (lista timijana, kadulje i lovora)	4
2.3. Fenolni spojevi	5
2.3.1. Flavonoidi	6
2.3.2. Neflavonoidi	6
2.4. Fenolni spojevi timijana, kadulje i lovora	7
2.5. Karotenoidi	7
2.6. Klorofili	9
2.7. Pigmenti timijana, kadulje i lovora	9
2.8. Antioksidativni kapacitet	10
2.9. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva	11
2.9.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.2. Kemikalije i standardi	13
3.3. Aparatura i pribor	14
3.4. Metode rada	15
3.4.1. Određivanje ukupne suhe tvari	15
3.4.2. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz selektiranih biljnih vrsta	16
3.4.3. Određivanje ukupnih fenola	17
3.4.4. Određivanje ukupnih flavonoida	18
3.4.5. Određivanje ukupnih hidrosicimetnih kiselina i flavonola	20
3.4.6. Određivanje klorofila i karotenoida	22
3.4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela polifenolnih spojeva	24
4.2. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela kloroplastnih	

pigmenata (ukupnih karotenoida, klorofila a i b) u ekstraktima listova timijana, kadulje i lovora	25
4.3. Antioksidativni kapacitet u ekstraktima timijana, kadulje i lovora	27
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA	30

1. UVOD

Začinske i aromatske biljke imaju široku primjenu u svakodnevnom životu te se od davnina koriste u kulinarstvu i za liječenje raznih bolesti. Hipokrat je koristio timijan za liječenje probavnih smetnji, a stari Egipćani su ga koristili u balzamiranju (Statham, 2016). Stari Rimljani su koristili kadulju kao sredstvo za zaustavljanje krvarenja, liječenje grlobolje i čireva, a Kinezi u liječenju bolesti jetre i bubrega (Throwbridge Flippone, 2019). Koristi lovora bile su zabilježene već u 1. stoljeću u radu liječnika cara Trajana (Kuštrak, 2005). Biljke roda Lamiaceae (usnače) i Lauraceae (lovorovke) predstavljaju vrste biljaka bogatih eteričnim uljima čiji udio i sastav varira ovisno o području rasta, periodu branja i dijelu biljke iz kojeg je eterično ulje izolirano (Zantar i sur., 2015).

Zadnjih par godina sve se više pažnje posvećuje začinskom i aromatskom bilju zbog prisutnosti bioaktivnih spojeva (BAS) zbog njihova antimikrobnog, antikancerogenog, antitumorskog i antioksidacijskog djelovanja. Zbog navedenih svojstava začinske i aromatske biljke imaju veliku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te medicini. Bioaktivni spojevi timijana, kadulje i lovora razlikuju se prema strukturi i polarnosti zbog čega je za njihovu izolaciju potrebno odabrati odgovarajuću metodu ekstrakcije. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva se uglavnom provodi konvencionalnim metodama uz upotrebu organskih otapala, ali u zadnje vrijeme sve se više primjenjuju i suvremene metode ekstrakcije zbog veće efikasnosti izolacije uz manje korištenje otapala (Vinatoru, 2001). Jedna od suvremenih metoda ekstrakcije je ekstrakcija ultrazvukom koja se pokazala kao izuzetno učinkovita i ekonomična metoda za izolaciju BAS (Khan i sur., 2010). Kako bi se izoliralo što više BAS potrebno je odabrati odgovarajuće otapalo za ekstrakciju. U otapala koja su se pokazala djelotvorna za izolaciju BAS ubrajaju se aceton, etanol, voda, heksan, a odabir otapala ovisi o strukturi dominantnih BAS (Kaurinovic i Vastag, 2019; Hamdy Roby i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio izolirati bioaktivne spojeve timijana, lovora i kadulje uzastopnom ekstrakcijom s tri različita ekstrakcijska otapala (heksan, 80% aceton i 96% etanol) primjenom ultrazvuka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kemijski sastav selektiranih biljnih vrsta: timijana, kadulje i lovora

Začinsko i aromatsko bilje od davnina je imalo važnu ulogu u narodu. U današnje vrijeme sve više se koristi u kulinarstvu, a zbog ljekovitih svojstva koristi se i u medicinske svrhe. Biljke iz porodica usnača (Lamiaceae) i lovora (Lauraceae) su od velikog značaja zbog velikog sadržaja eteričnih ulja te svojih nutritivnih i kemijskih svojstava. Koriste se kao začinske biljke u pripremi jela te kao ljekovite biljke u narodnoj medicini. Hrvatska zahvaljujući klimatskim raznolikostima ima veliki potencijal za proizvodnju različitih vrsta začinskog i aromatskog bilja kao što su timijan, kadulja i lovor koji su vrijedan izvor bioaktivnih tvari specifičnoga djelovanja, posebice polifenola, karotenoida i klorofila.

2.1.1. Timijan (*lat. Thymus vulgaris L.*)



CARSTVO: Plantae

RED: Lamiales

PORODICA: Lamiaceae

ROD: Thymus

VRSTA: Thymus vulgaris L

Slika 1. Timijan (Nielsen i sur., 2015)

Thymus vulgaris je polužbunasta, višegodišnja, zeljasta mediteranska biljka iz porodice Lamiaceae visoka 20-30 cm. Karakteriziraju ju uspravna, četverobridna stabiljka sa malim tamnozelenim trakastim listovima savijenim prema dnu stabiljke. Timijan počinje cvat u travnju, dok puni cvat postiže u lipnju kada su vidljivi mali bijeli do ružičasti cvjetovi (Zantar i sur., 2015). Kao samonikla biljka rasprostranjen je na sjeverozapadnom dijelu Sredozemlja, pretežito na suhim i sunčanim mjestima, po vapnenoj podlozi i kamenim predjelima (Kuštrak, 2005). Ima veliku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te medicini zbog svog antiviralnog, antiseptičkog, antimikrobnog i antifungalnog djelovanja. Ujedno, ima i jedno od najvećih antioksidativnih svojstva među biljem (Dauqan i Abdullah, 2017). Najznačajnija komponenta timijanovog lista je eterično ulje, a osim njega u listu su prisutni flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline, triterpeni, ugljikovodici, bifenili, tanini i saponini (Kuštrak, 2005).

2.1.2. Kadulja (*lat. Salvia Officinalis L.*)



CARSTVO: Plantae
RED: Lamiales
PORODICA: Lamiaceae
ROD: Salvia
VRSTA: Salvia officinalis L.

Slika 2. Salvia Officinalis L. (Nikolić, 2015)

Ljekovita kadulja je polugrmovita biljka visine 30-70 cm iz porodice Lamiaceae. Ima slaborazgranatu drvenastu stabiljku sa uskim, eliptičnim listovima koje prekrivaju srebrno-zelene dlačice. U periodu između svibnja i lipnja na vrhu ogranaka razvijaju se ljubičasti cvjetovi (Kuštrak, 2005.). Rasprostranjena je kao samonikla biljka na kamenitom, krškom tlu po priobalju i otocima Sredozemlja. Koristi se u prehrambenoj industriji kao dodatak jelima, ali i u farmaceutskoj industriji i medicini zbog svojeg antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja. Najvažnija komponenta listova je eterično ulje, a osim njega u listovima su prisutni diterpeni (karnozol i karnozolna kiselina), triterpeni (oleanolna i ursolna kiselina, germanikol) i flavonoidi (apigenin, luteolin i njihovi glikozidi) (Kuštrak, 2005).

2.1.3. Lovor (*lat. Laurus nobilis L.*)



CARSTVO: Plantae
RED: Laurales
PORODICA: Lauraceae
ROD: Laurus L.
VRSTA: Laurus nobilis L.

Slika 3. Laurus Nobilis (Mithad, 2019)

Lovor je višegodišnji, vazdazeleni grm ili nisko stablo iz porodice lovora. Rasprostranjen je na području južne Europe i Sredozemlja (Caputo i sur., 2017), a u Hrvatskoj je najrasprostranjeniji u Istri i Dalmaciji (Kuštrak, 2005). Prepoznatljiv je po kratkoj peteljci sa kožastim tamnozelenim eliptičnim listovima koji se sabiru nakon zrenja plodova, u kasnu jesen (slika 3.) (Kuštrak, 2005). Cvijetici lovora su zelenkasto bijeli, a plod crna bobica čiji mesnati dio sadrži eterično ulje. Njegovi listovi se tradicionalno koriste kao začim, ali i u medicinske

svrhe zbog antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava. Suhi list sastoji se od 7% proteina, 9% masnoće, 50% ugljikohidrata i 25% sirovih vlakna. Bogat je mineralima i vitaminima B skupine, a najvažnija komponenta je eterično ulje pri čemu se polaganim sušenjem postiže puna aroma lovora (Attokaran, 2013).

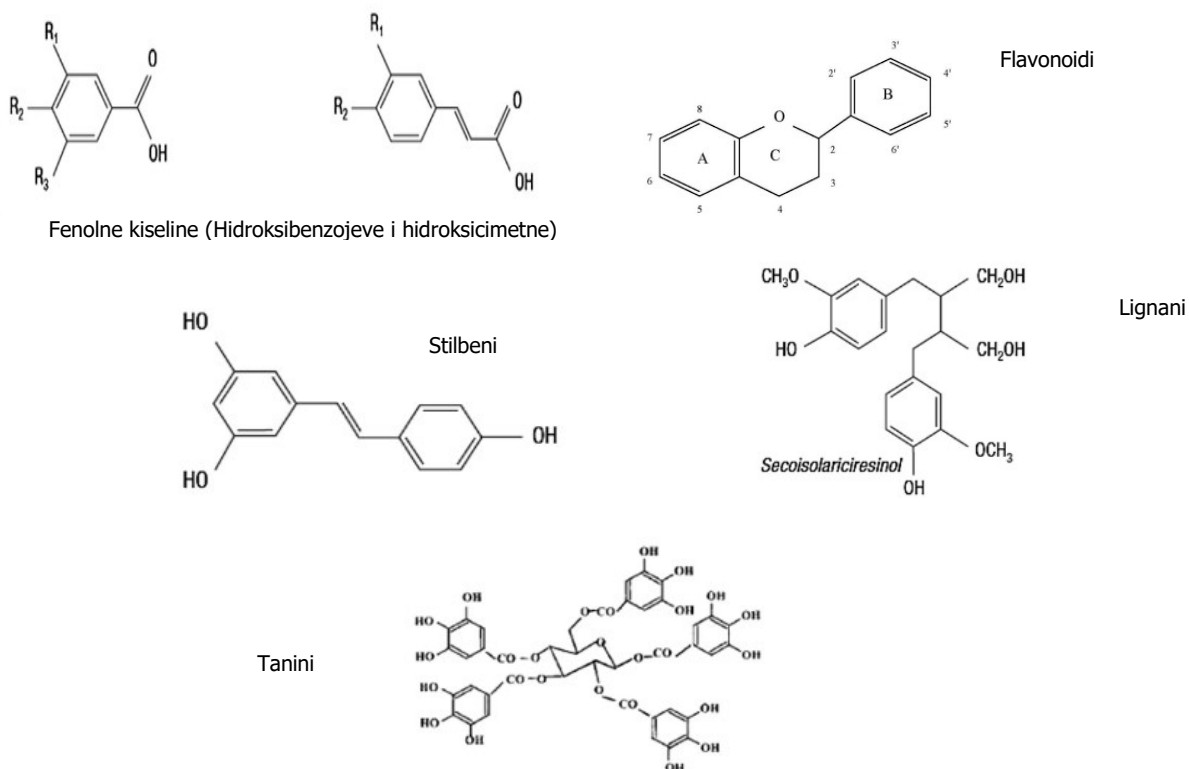
2.2. Eterična ulja selektiranih biljnih vrsta (lista timijana, kadulje i lovora)

Karakteristični sastojak svake biljke je njezino eterično ulje. Eterična ulja privlače insekte, štite biljku od hladnoće i vrućine i djeluju antiomikrobno. Današnja upotreba eteričnih ulja ima široku primjenu u farmaciji, prehrambenoj industriji, aromaterapiji i medicini. Eterična ulja sadrže lako hlapljive aromatične spojeve specifičnog mirisa koji su topivi u lipofilnim otapalima te slabo topivi u vodi. Po sastavu to su heterogene tekuće smjese u kojima su u najvećoj mjeri zastupljeni terpeni. Osim njih, prisutni su alkoholi, eteri, esteri, fenoli, aldehidi, ketoni, amini i amidi (Dhifi i sur., 2016). Timijan sadrži 1,0-2,5% eteričnog ulja koje se tradicionalno dobiva destilacijom vodenom parom. Žute je do crvenkaste boje i jakog mirisa po timolu te aromatičnog okusa. Za intenzivan miris i okus zaslužni su terpeni od kojih su najzastupljeniji fenolni monoterpeni timol, karvakrol, p- cimen i 1,8 -cineol i terpenski alkoholi linalol, geraniol i borneol (Dauqan i Abdullah, 2017; Kuštrak, 2005). Sastav eteričnog ulja jako je promjenjiv te se s obzirom na udio navedenih komponenti eterično ulje timijana može klasificirati u najmanje 6 kemotipova koji se međusobno razlikuju po djelovanju (Satyal i sur., 2016.; Dauqan i Abdullah, 2017). U prirodi su najzastupljeniji kemotipovi timol i karvakrol koji su snažni antiseptici sa visokim udjelom timola i karvakrola (Kuštrak, 2005). Destilacijom vodenom parom suhog lovorovog lista proizvede se 1-3 % eteričnog ulja. Eterično ulje je zelenkastožute do svijetložute boje aromatičnog okusa i intenzivnog mirisa zbog prisutnih terpena među kojima je najviše prisutan monoterpen 1,8- cineol. Od značajnih komponenti ističu se monoterpenoid α -terpinil acetat, ciklički monoterpeni sabinen, limonen, α - pinen i β - pinen, terpenski alkoholi linalol, eugenol, α - erpineol i terpinen-4-ol (Kuštrak, 2005; Derwich i sur., 2009). Navedeni spojevi zaslužni su za antioksidativno i antimikrobno djelovanje lovora. Osim navedenih komponenti, u eteričnom ulju prisutne su još treslovine i gorke tvari (Dudaš i Venier, 2009). Listovi ljekovite kadulje sadrže 1- 2,5% eteričnog ulja koje je najčešće svijetložute boje, a udio ulja ovisi o periodu branja i području rasta. Najveći udio eteričnog ulja nalazi se u listovima ubranim u srpnju (Kuštrak, 2005). Dobra antioksidativna i antimikrobna svojstva pripisuju se prisutnosti monoterpena i seskviterpena u velikim koncentracijama. Od značajnih kemijskih spojeva u eteričnom ulju prisutni su ciklički monoterpenski keton kamfor,

terpenski alkoholi 1,8-cineol i borneol, monoterpeni α - tujon i β - tujon, biciklički seskviterpen β -kariofilen i seskviterpenoid viridiflorol (Khedher i sur., 2017).

2.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi najrasprostranjenija su skupina sekundarnih biljnih metabolita. Nalaze se u sjemenkama, kori i koži voća gdje imaju važnu ulogu u biljnom obrambenom mehanizmu, a osim tog zaslužni su za organoleptička svojstva hrane. Zbog antioksidacijskog, antimikrobnog i antikancerogenog djelovanja imaju veliku primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Većina fenolnih spojeva dobivena je iz trans cimentne kiseline, nastale iz L-fenilalanina djelovanjem fenilalanin- amonij- liaze (PAL) koja povezuje šikimatski put i fenilpropanoidni put (Vladimir-Knežević i sur., 2012). Karakterizira ih najmanje jedan aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Crozier i sur., 2006). Prema broju i rasporedu ugljikovih atoma dijele se na: flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, lignane i tanine (slika 4.), (Ignat i sur., 2011). Tanini su polifenolni sekundarni metaboliti prisutni u višim biljnim vrstama. Prema svojoj građi dijele se na: galotanine, elagitanine, kompleksne i kondenzirane tanine (procijanidine) (Karamali Khanbabaee i van Ree, 2001). Aktivnost tanina ovisi o njihovoj građi, ali u načelu svi tanini pokazuju dobru antioksidativnu, antimikrobnu i antiviralnu aktivnost.



Slika 4. Podjela fenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011)

2.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu fenola i do danas je identificirano više od 10000 flavonoida (Dixon i sur., 2010). Građeni su od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u 2 aromatska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C). Kod većine flavonoida piranski prsten je zatvoren, izuzev halkona kod kojih je otvoren. U prirodi mogu biti prisutni u slobodnoj formi i u formi glikozida, pri čemu su najčešće prisutni u formi O- i C-glikozida (Crozier i sur., 2006). Flavonoidi se ovisno o broju i položaju vezanih grupa dijele na (Ignat i sur., 2011):

- a) Flavanole - katehine, epikatehine i njihove izomere
- b) Flavonole - miricetin, kvercetin, kamferol i izorhamnetin
- c) Flavone - apigenin, luteolin, nobiletin, tangeretin
- d) Izoflavone - daidzein, genistein i kumestrol
- e) Flavanone – naringenin, hesperidin,
- f) Antocijanidine - pelargonidin, cijanidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin

Supstituenti vezani na prsten utječu na polarnost vrste pa se prema topljivosti mogu podijeliti na lipofilne i hidrofilne. Manje polarni aglikoni kao izoflavoni, flavanoni, flavonoli i flavoni koji su metilirani uglavnom se ekstrahiraju otopinama kao benzene, diklorometan, kloroform, dietil eterom ili etil acetat. Polarnije vrste kao flavonoid glikozidi i polarniji aglikoni se uglavnom izoliraju iz biljnog materijala ekstrakcijom sa acetonom, alkoholima, vodom ili smjesom alkohola i vode.

2.3.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi su skupina fenolnih spojeva u koje spadaju fenolne kiseline koje se dijele u dvije osnovne grupe: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te stilbeni. Hidroksicimetne kiseline građene su od devet ugljikovih atoma i uglavnom su u prirodi prisutne u formi njihovih estera i u konjugiranom obliku (Crozier i sur., 2006). U hidroksicimetne kiseline ubrajaju se: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, klorogenska i sinapinska kiselina. Strukturu hidroksibenzojevih kiseline čini kostur od sedam ugljikovih atoma i u njih se ubrajaju: galna, salicilna, protokatehinska, siringinska i vanilinska kiselina (Saibabu i sur., 2015).

Stilbeni su fitoaleksini prisutni najviše u vinu, citrusima i orašastim plodovima. Najčešći stilben je resveratrol koji postoji u *cis* i *trans* obliku, a u biljkama se nalazi uglavnom u obliku *trans*-resveratrol-3-O-glikozida. Tanini su polifenolni sekundarni metaboliti koji zbog kompleksnosti svoje građe nisu nužno polifenolne strukture (Karamali Khanbabaee i van Ree, 2001).

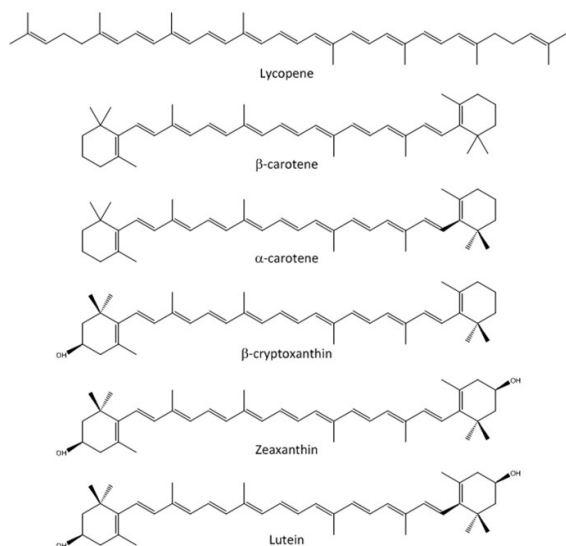
2.4. Fenolni spojevi timijana, kadulje i lovora

Prema dosadašnjim istraživanjima, udio i sastav fenolnih spojeva različiti su u svakoj biljci zbog utjecaja različitih čimbenika kao npr. klimatsko podneblje, lokalitet i vrijeme berbe te se ne mogu odrediti egzaktne koncentracije i jedinstven sastav vrste. Tako npr. prema istraživanju Hamdy Roby i suradnika (2013) timijan sadrži 8.10 ± 2.00 mg GAE/g s.tv. ukupnih fenola, od čega fenolne kiseline čine oko 60%, a ostatak prisutnih spojeva su flavonoidi. Identificirane fenolne kiseline po svojoj vrsti su hidroksicimetne kiseline, od kojih je najdominantnija cimetna, a u manjoj mjeri su prisutne ružmarinska i ferulinska kiselina te njihovi derivati dok flavonoidnu frakciju timijana uglavnom čine flavoni (apigenin i luteolin), a u manjem omjeru flavonoli (kvercetin), (Hamdy Roby i sur., 2013). U navedenom istraživanju također je određen i udio fenolnih spojeva kadulje (5.95 ± 2.65 mg GAE/g s.tv.), a 70% identificiranih fenolnih spojeva čine fenolne kiseline od kojih su najzastupljenije hidroksicimetne kiseline ružmarinska, ferulinska kiselina, cimetna i kafeinska kiselina te esteri kafeinske kiseline (Dent i sur. 2017, Hamdy Roby i sur., 2013). U kadulji je prisutan također i značajni udio flavonoida i to flavona apigenina i luteolina te flavonola kvercetina koji doprinose antioksidacijskom djelovanju kadulje. Prema istraživanju Dhifi i suradnika (2016) lovorov list sadrži 174.1 mg GAE /g s.tv. ukupnih fenola te 149.2mg CE /g s.tv. ukupnih flavonoida. Prema literaturnim podacima najznačajnija skupina flavonoida u lovoru su flavonoli kamferol i kvercetin te njihovi glikozidi te flavoni (luteolin) (Zhilyakova i sur., 2017, Kaurinovic i Vastag, 2019). Od neflavonoidnih spojeva u ekstraktu lovorovog lista određene su hidroksibenzojeve (*p*-hidroksibenzojeva kiselina), te hidroksicimetne kiseline (ružmarinska i kafeinska kiselina) (Kaurinovic i Vastag, 2019).

2.5. Karotenoidi

Karotenoidi su crveni, žuti i narančasti pigmenti prisutni u voću, povrću i nekim životinjama (losos, rak, jastog). Ime su dobili po mrkvi (*eng. carrot*) u čijem korijenu predstavljaju dominantni pigment (Rodriguez-Amaya, 2016). Izolirano je i okarakterizirano oko 800 vrsta karotenoida. Prema građi su lipofilni C₄₀ tetraterpeni/tetraterpenoidi građeni od 8 C₅ izoprenskih jedinica povezanih dvostrukim konjugiranim vezama (Rodriguez- Amaya, 2016). Kao lipofilne molekule topljivi su u organskim otapalima kao što su aceton, etil eter, etil acetat i kloroform. Prirodni karotenoidi uglavnom su u trans obliku, a procesiranjem može doći do izomerizacije u cis oblik. Mogu biti u acikličkom obliku (likopen), imati prstenastu strukturu na jednom ili na oba kraja lanca (α -karoten i β -karoten). Karotenoidi se dijele u dvije skupine:

ksantofile (lutein, zeaksantin i β -kriptoksantin) i karotene (α -karoten, β -karoten i likopen) (slika 5). Ksantofili za razliku od karotena sadrže funkcionalne skupine zbog čega su polarniji (Rodriguez-Amaya, 2016).



Slika 5. Karotenoidi (Marhuenda-Muñoz i sur., 2019)

U biljnim organizmima su važni za proces fotosinteze jer apsorbiraju svjetlost valnih duljina koje klorofili ne mogu apsorbirati te štite tkiva apsorbirajući energiju singletnog kisika (Rodriguez-Amaya, 2016). Sinteza karotenoida se odvija u plastidima. Prvi korak u biosintezi karotenoida je kondenzacija dviju molekula geranilgeranil pirofosfata (GGPP) i stvaranje bezbojnog fitoena uz pomoć enzima fitoen sintaze. Drugi korak je desaturacija iz fitoena do likopena, nakon čega slijedi ciklizacija likopena do α - i β -karotena. α -karoten se uzastopnim hidroksilacijama konvertira u lutein, a β -karoten u zeaksantin iz kojeg nastaje violaksantin posredstvom anteraksantina (Kato i sur., 2004).

Karotenoidi su jaki antioksidansi, a najefikasnije djeluju na suprimaciju aktivnosti peroksidnog radikala koji je odgovoran za oštećenja lipofilnih dijelova stanica (Sies i Stahl, 1995). Osim antioksidativnog, karotenoidi imaju i antikancerogeno i antitumorsko djelovanje. Pregledom literature utvrđeno je kako likopen ima pozitivan učinak na suprimaciju rasta tumorskih stanica te smanjuje rizik od raka (Ono i sur., 2015). α -karoten, β -karoten i β -kriptoksantin prekursori su za sintezu vitamina A (retinola) koji utječe na funkcioniranje imunološkog sustava, rast i razvoj te kvalitetu vida (Huang i sur., 2018). Karotenoidi se također koriste kao prirodna prehrambena bojila.

2.6. Klorofili

Klorofili su zeleni pigmenti koji se nalaze u kromoplastima vaskularnih biljaka, algi i bakterija te imaju važnu ulogu u apsorpciji i prijenosu svjetlosne energije u procesu fotosinteze. Građeni su od tetrapirolskog porfirinskog prsten u čijem je središtu ion magnezija. Postoji nekoliko različitih vrsta klorofila: klorofil a, b, c i d te bakterioklorofili koji su detektirani u određenim vrstama bakterija (Gross, 1991). Klorofil a je najznačajniji (primarni) fotosintetski pigment jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, dok su sve ostale vrste klorofila sekundarne jer imaju pomoćnu i zaštitnu ulogu u procesu fotosinteze. Klorofili a i b zastupljeni su u zelenim biljkama i apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu spektra zbog čega biljke imaju intenzivnu boju, a klorofili c i d prisutni su u nekim protistima i cijanobakterijama (Taiz i Zeiger, 2010). U biljkama se za vrijeme njihovog životnog ciklusa istovremeno odvijaju procesi sinteze klorofila i njegove degradacije. Biosintetski put klorofila odvija se u plastidima, a sastoji se od niza reakcija koje se mogu podijeliti u 3 faze: faza biosinteze, klorofilni ciklus i katabolička faza. U prvoj fazi formira se osam molekula δ -aminolevulininske kiseline (δ -ALA) iz kojih nizom procesa dekarboksilacije i oksidacije nastaje protoporfirin IX. Insercijom magnezijevog iona (Mg^{2+}) u protoporfirin IX nastaje klorofilid a iz kojeg nastaje klorofil a djelovanjem enzima klorofil sintetaze (Taiz i Zeiger, 2010). U drugoj, odnosno klorofilnoj fazi klorofil a se konvertira u klorofil b djelovanjem enzima oksigenaze. U posljednjoj, kataboličkoj fazi koja se odvija u kloroplastima i vakuolama, klorofil a se degradira u feoforbid a (Taiz i Zeiger, 2010). Klorofili i njihovi derivati imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Koriste se kao bojila za mliječne proizvode, slatkiše, jestiva ulja (izuzev maslinovog), u koncentratima za juhe, bezalkoholnim pićima, ali i lijekovima (Roca i sur., 2016; Lanfer Marquez i Borrmann, 2009; E brojevi, 2007).

2.7. Pigmenti timijana, kadulje i lovora

Timijan, lovor i kadulja bogati su izvor pigmenta kao što su karotenoidi i klorofili. Prema istraživanju El-Qudah (2014) u timijanu je određeno 7,322 $\mu\text{g/g}$, od čega veći udio čine ksantofili (lutein i zeaksantin), a osjetno manje karoteni (β -karoten).

Znatno veći udio karotenoida određen je u kadulji (1989 $\mu\text{g/100g}$), gdje je pak određen veći udio karotena (β -karoten), a neznatno manje ksantofila luteina i zeaksantina (Daly i sur., 2010). Prema istraživanju Berim i suradnika (2015) udio karotenoida u lovoru iznosio je $68.84 \pm 1.49 \mu\text{g/g}$, a najzastupljeniji su bili β -karoten i ksantofil lutein.

Pregledom literature u ekstraktima timijana, lovora i kadulje najzastupljeniji su klorofili a i b, pri čemu je dominantniji klorofil a. Od selektiranih biljnih vrsta najviše klorofila sadrži timijan (4,13 mg/g), zatim lovor ($168,9 \pm 5,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i najmanje kadulja (77.15 $\mu\text{g}/\text{g}$) (El-Qudah, 2014; Murillo-Amador i sur., 2014; Arena i sur., 2008).

2.8. Antioksidativni kapacitet

Antioksidansi su komponente koje sprečavaju štetno djelovanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS-a ili Reactive Oxygen Species). Reaktivne kisikove čestice kao peroksidni radikal, superoksidni anion, hidroksilni radikal i aktivni oblici dušika produkti su normalnih tjelesnih funkcija i ključni su za opskrbu organizma energijom (Roginsky i Lissi, 2005). Uslijed pada imuniteta i stresa dolazi do njihove pojačane proizvodnje koja je uzrok oksidativnog stresa i bolesti povezanih sa njima kao što su rak i kardiovaskularne bolesti, zbog čega je djelovanje antioksidansa od iznimne važnosti. Kao prirodno prisutni, antioksidansi se mogu podijeliti na enzimске i neenzimске, od kojih su najčešće zastupljeni u voću i povrću vitamini A,C,D i E, minerali i peptidi te karotenoidi. Najznačajnije skupine prirodnih antioksidansa u začinskom bilju su polifenoli (Imitiaz i sur., 2018). Antioksidativna svojstva fenola povezuju se s njihovom aromatskom strukturom koja omogućava delokalizaciju elektrona i doniranje vodikovih atoma što dovodi do inaktivacije slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

Pregledom literature utvrđeno je kako biljne vrste sa većim udjelom fenolnih spojeva imaju veći antioksidativni kapacitet, pri čemu vrste sa većim udjelom flavonoida od fenolnih kiselina imaju jače antioksidativno djelovanje (Spiridon i sur., 2011; Dent i sur., 2017; Hamdy Roby i sur., 2013). Za veliku antioksidativnu aktivnost timijana zaslužne su glave sastavnice njegovog eterično ulja timol i karvakrol koje su poznate po svom antioksidativnom djelovanju. Chizzola i suradnici (2008) su mjerenjem antioksidativne aktivnosti eteričnih ulja timijana DPPH i FRAP metodom dokazali kako eterična ulja bogata timolom i fenolnim spojevima imaju veći antioksidativni kapacitet nego ulja koja sadrže terpineol, geraniol i sabinen hidrat.

Antioksidativna svojstva lovora i kadulje vežu se za prisutnost fenolnih spojeva, poglavito ružmarinske kiseline koja se pokazala učinkovitom u prevenciji staničnih oštećenja uzrokovanim slobodnim radikalima (Dudaš i Venier, 2009; Dent i sur., 2017). Da bi se odredio antioksidativni kapacitet razvijene su metode koje se temeljene na različitim obrambenim reakcijama prema slobodnim radikalima koje uključuju inhibiranje i reduciranje njihove aktivnosti. U njih se ubrajaju direktne metode (ORAC metoda i metoda određivanje antioksidacijskog kapaciteta s β -karotenom) i indirektna metode (ABTS, DPPH, FRAP) (Roginsky i Lissi, 2005). Za određivanje antioksidativnog kapaciteta začinskog bilja najčešće

se provodi ORAC metoda. Prednosti ORAC metode u odnosu na ABTS i DPPH je što ORAC testovi koriste peroksidne radikale koji su pokazali veliku učinkovitost u reakcijama sa slobodnim radikalima te je provođenje analize automatizirano što omogućava kontinuiranu generaciju radikala i može se prilagoditi za detekciju hidrofилnih i hidrofobnih radikala. Nedostatak ORAC testa je osjetljivost na promjene temperature što može utjecati na točnost rezultata (Prior i sur., 2005).

2.9. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva

Ekstrakcija je metoda koja se koristi za koncentriranja i razdvajanja smjese tvari. Provodi se na temelju različite topljivosti smjese u različitim otapalima koja se ne miješaju međusobno. Metode ekstrakcije se dijele na: destilaciju, ekstrakciju otapalima, hladno prešanje i nekonvencionalne tehnike (Vinatoru, 2001).

Na učinkovitost ekstrakcije utječe viskoznost otapala, volumni protok otapala, površina namirnice koja je izložena otapalu, topljivost komponenti u otapalu i temperatura ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Potrebno je provoditi ekstrakciju pri optimalnoj temperaturi kako bi otapanje komponenti bilo što brže i time proces ekstrakcije uspješniji. Treba naglasiti da više temperature nisu poželjne jer mogu dovesti do oštećenja termolabilnih spojeva ili ekstrakcije nepoželjnih spojeva. Bitan faktor u ekstrakciji je također priprema uzorka za ekstrakciju. Bolje rezultate ekstrakcije daju finije usitnjeniji uzorci, iako kod premale veličine čestica uzorka može doći do prevelike absorpcije otapala (Zhang i sur., 2018). Pregledom literature kao najčešća otapala za izolaciju bioaktivnih spojeva koriste se etanol, metanol, etil acetat, aceton i voda (Kaurinovic i Vastag, 2019; Hamdy Roby i sur., 2013; Dent i sur., 2013). Pri tome zastopna ekstrakcija otapalima sve veće polarnosti može dati frakcije s različitim skupinama bioaktivnih spojeva. Stoga je nužno odabrati odgovarajuću metodu i uvjete ekstrakcije kako bi izolirali željene spojeve u što većim udjelima.

2.9.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se pokazala kao jako efikasna i ekonomična metoda za izolaciju bioaktivnih spojeva. Ultrazvuk je zvuk frekvencija 20 kHz do 100 MHz (Azmir i sur., 2013). Ultrazvuk frekvencije 20 - 100 kHz i intenziteta 1 - 1000 W/cm² izaziva strukturne promjene biljnog materijala i time olakšava prodor ekstrakcijskog otapala zbog čega je vrijeme trajanja ekstrakcije kraće (Vinatoru, 2001). Ultrazvuk se može primjenjivati u obliku sonde i u obliku kupelji. Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i

relativno su jeftine, a uglavnom rade na frekvenciji od 20-40 kHz. Ekstrakcija s direktno uronjenom sondom provodi se da se u tekući uzorak, uroni ultrazvučna sonda, ali nedostatak je da se istovremeno ne može provoditi ekstrakcija na više uzoraka jer je sonda tijekom cijelog postupka ekstrakcije u neposrednom dodiru s uzorkom (Khoddami i sur., 2013). Uzorak se tretira ultrazvukom uz miješanje kako bi se temperatura koja nastaje tijekom kolapsa kavitacijskih mjehurića ravnomjerno prenijela na čitav uzorak. Za razliku od klasične ekstrakcije gdje se temperatura konstantno održava za vrijeme ekstrakcije, kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uslijed djelovanja ultrazvuka dolazi do zagrijavanja sustava tijekom procesa ekstrakcije te je potrebna stalna kontrola temperature kako ne bi došlo do razgradnje termolabilnih spojeva koji se žele ekstrahirati (Ren i sur., 2013). Prilikom prolaska ultrazvučnih valova kroz medij, dolazi do nastajanja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka, odnosno fluktacije tlaka, što rezultira pojavom kavitacije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kavitacija je pojam koji označava formiranje mjehurića plina u tekućem mediju. Veličina mjehurića oscilira tako da se u ekspanziji povećavaju, a u kompresiji smanjuju. Kavitacija potiče ekstrakciju na način da uzrokuje oštećenja stanične stijenke i povećanje brzine difuzije što olakšava ispiranje sastojaka iz stanice. Za povećanje efikasnosti ekstrakcije, potrebno je optimizirati izbor otapala, temperaturu i tlak, vrijeme tretiranja te frekvenciju, snagu i distribuciju ultrazvučnih valova (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz ljekovitog bilja u mnogim istraživanjima su se kao otapalo primjenjivale mješavine metanol/etanol - voda te aceton - voda (Wang i sur., 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Sušeni timijan, listovi lovora i kadulje kupljeni su od firme „Suban d.o.o.“ tijekom veljače 2020. godine. Uzorci su skladišteni na suhom i tamnom mjestu te su neposredno prije provođenja analiza samljeveni.

3.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupak ekstrakcije

- heksan
- 96% etanol
- 80% aceton
- etil acetat

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje

- Folin-Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/ v)

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- Standard galne kiseline ($\gamma=5$ g /L)

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- Etanol (96 %, v/ v)
- Metanol (100, v/ v)
- Etil acetat
- Aluminijev klorid (10 %, w/ v)

Priprema: 1 g aluminijevog klorida (aluminij klorid heksahidrata) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalijev acetat ($c=1$ M)

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetina ($\gamma=100$ mg /L)

Priprema: Odvaži se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu

volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrjeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.

- Koncentrirana klorovodična kiselina (37 %, v/ v)
- Klorovodična otopina ($\gamma=1\text{g/L HCl}$)

Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.

- Klorovodična otopina ($\gamma=2\text{g/L HCl}$)

Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Standard kafeinske kiseline ($\gamma=100\text{ mg L}^{-1}$)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kafeinske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

- Standard klorogenske kiseline ($\gamma=100\text{ mg L}^{-1}$)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

- Fosfatni pufer (75 mM, pH 7,0)
- Otopina standarda – Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)
- AAPH (240 mM) (2,2'-azobis(2-amidinopropionamid)-dihidroklorid)
- Fluorescein (70,3 nM)

3.3. Aparatura i pribor

- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex)
- Mikropipeta 100 i 1000 μL
- Stakleni štapić
- Aluminijska posudica
- Eksikator
- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- Staklene kivete
- Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01\text{g}$)

- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1 L
- Staklene epruvete 10 mL
- Plastične ladice za vaganje
- Falcon epruvete 25 mL
- Rotacijski uparivač
- Odmjerne tikvice volumena 10 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL i 250 mL
- Stakleni lijevak
- Filter papir
- Centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Laboratorijski sušionik (ST-01/02, INSTRUMENTARIA)
- Eksikator
- Eppendorf epruvete volumena 2,5 mL
- Mikrolitarska pločica sa 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.4. Metode rada

Iz listova timijana, lovora i kadulje su dobiveni ekstrakti postupkom uzastopne ekstrakcije sa tri različita ekstrakcijska otapala (heksan, 80% aceton i 96% etanol) primjenom ultrazvuka u kojima se potom spektrofotometrijski određivao maseni udio polifenolnih spojeva, karotenoida i klorofila. Također je u acetonskim i etanolnim ekstraktima određen antioksidativni kapacitet ORAC metodom.

3.4.1. Određivanje ukupne suhe tvari

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Svaka sirovina se sastoji od djela vode i suhe tvari. Određivanje ukupne suhe tvari proizvoda provodi se sušenjem na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984).

Priprema uzorka:

Početne sušene uzorke timijana, kadulje i lovora potrebno je prije mjerenja usitniti i homogenizirati.

Postupak određivanja:

U osušenu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C u trajanju od 60 minuta sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću

$\pm 0,0002$ g. U ovako pripremljenu posudicu izvaže se 2,5 g pripremljenog uzorka s točnošću $\pm 0,0002$ g i pomoću staklenog štapića dobro se izmiješa s kvarcnim pijeskom. Zatim se posudica s uzorkom stavi u sušionik zagrijan na $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i zagrijava 60 minuta sa skinutim poklopcem. Nakon isteka vremena, posudica sa uzorkom se stavi u eksikator na hlađenje, te se nakon toga važe s točnošću $\pm 0,0002$ g. Sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja ne bude manja od 0,001 g.

Ukupna suha tvar izračuna se prema slijedećoj formuli:

$$\text{ukupna suhatvar}(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

gdje je:

m_0 – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g)

m_1 – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g)

m_2 – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g)

3.4.2. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz selektiranih biljnih vrsta

Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz selektiranih biljnih vrsta koristila se sukcesivna ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom jer ultrazvučna ekstrakcija poboljšava kvalitetu ekstrakata, smanjuje vrijeme ekstrakcije, troškove i volumen otapala (González de Peredo i sur., 2019). Odvaže se 2,5 g uzorka s točnošću $\pm 0,01$ prethodno usitnjenih listića biljke u falkon epruvetu od 100 ml te se doda 25 mL ekstrakcijskog otapala heksana. Sadržaj falkon epruvete se stavi u ultrazvučnu kupelj 30 minuta pri $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po završetku ekstrakcije sadržaj epruvete se centrifugira (3500 okretaja/15 minuta) te se supernatant uparava do suha i zatim se otopi u 50 mL etil acetata (frakcija 1). Preostali talog se nakon centrifugiranja otopi u 25 ml 80 % acetona te se ponovi ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji i centrifugiranje uzorka. Supernatant se prebaci u odmjernu tikvicu od 50 ml i nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom (frakcija 2). Nakon druge ekstrakcije preostali talog se otopi u 25 ml 96% etanola, pod istim uvjetima ponovi se ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji i centrifugiranje te se supernatant prebaci u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni do oznake sa ekstrakcijskim otapalom (frakcija 3). Ekstrakti se čuvaju na hladnom i tamnom mjestu, pri temperaturi $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja analiza.

Tablica 1. Nazivi frakcija uz pripadajuće oznake

Sadržaj frakcije	Oznaka
Prva frakcija timijana (otapalo etil acetat)	T1
Druga frakcija timijana (otapalo 80 % aceton)	T2
Treća frakcija timijana (otapalo 80 % etanol)	T3
Prva frakcija lovora (otapalo etil acetat)	L1
Druga frakcija lovora (otapalo 80 % aceton)	L2
Treća frakcija lovora (otapalo 80 % etanol)	L3
Prva frakcija kadulje (otapalo etil acetat)	K1
Druga frakcija kadulje (otapalo 80 % aceton)	K2
Treća frakcija kadulje (otapalo 80 % etanol)	K3

3.4.3. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli se određuju spektrofotometrijski pri čemu se metoda temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog plavog obojenja pri 765 nm (Shortle et al., 2014). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volmframov oksid i molibdenov oksid koji su plave boje. Redukcija ovih kiselina, odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima.

Postupak određivanja

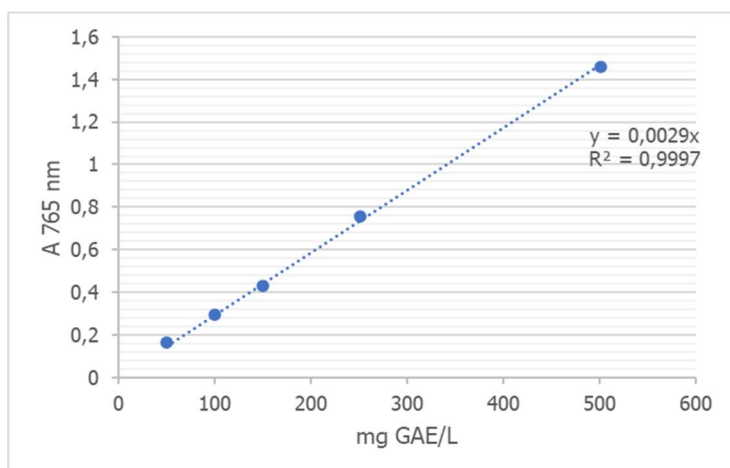
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri $T=50$ °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se zatim termostatiraju 25 minuta pri $T=50$ °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 6). Maseni udjeli ukupnih fenola izražavaju se kao ekvivalenti galne kiseline mg GAE/100 g suhe tvari uzorka.



Slika 6. Baždarni pravac ukupnih fenola

3.4.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Postupak određivanja

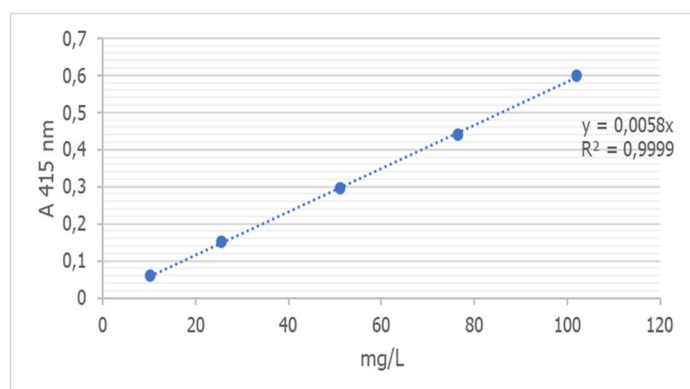
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10%-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Izrada baždarnog pravca

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100%-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10%-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 7).



Slika 7. Baždarni pravac ukupnih flavonoida

3.4.5. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje se provodi u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm i 360 nm (Howard i sur., 2003).

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L ekstrakta, 250 μ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

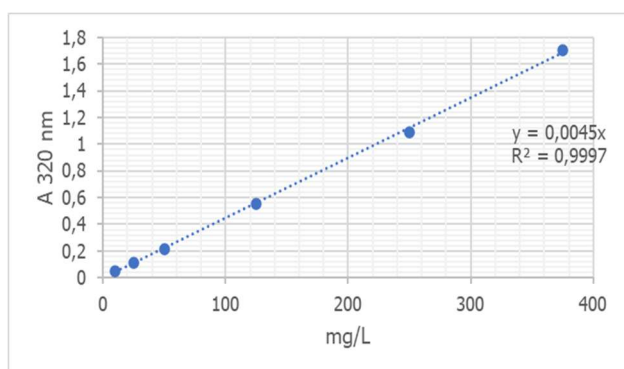
Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu, dok se kvantifikacija ukupnih flavonola provodi pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin.

a) Kafeinska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 500 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja 9,23, 23,99, 49,82, 99,63, 147, 60, 228, 78 mg/L.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm. Na temelju dobivenih rezultata dobije se jednadžba pravca (Slika 8).

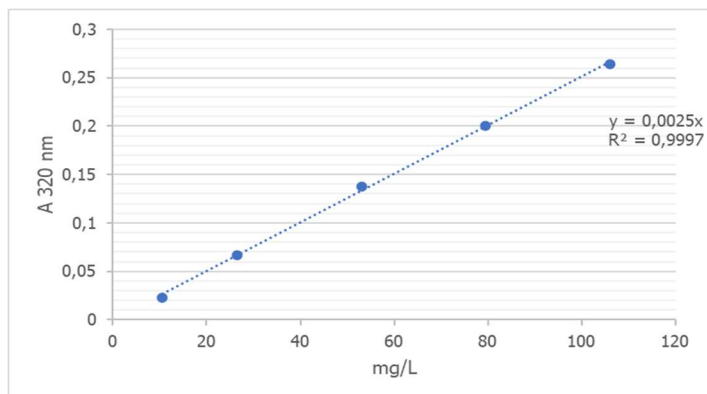


Slika 8. Baždarni pravac kafeinske kiseline za hidroksicimetne kiseline

Klorogenska kiselina

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2.5, 5 i 6.67 mL i nadopuni 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje

ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm te se na temelju dobivenih rezultata konstruira jednadžba pravca (Slika 9). Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izražavaju se kao ekvivalent kafeinske kiseline (mg CAE 100 g suhog lista kadulje),

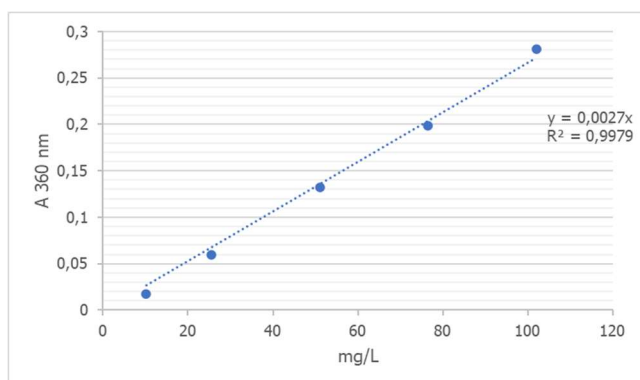


Slika 9. Baždarni pravac klorogenske kiseline za hidroksicimetne kiseline

b) Kvercetin

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25, i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0,25, 0,5, 1, 2,5 i 5 mL i nadopuni 100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm te se na temelju dobivenih rezultata konstruira jednadžba pravca (Slika 10). Maseni udjeli flavonola izražavaju se kao ekvivalent kvercetina.



Slika 10. Baždarni pravac za ukupne flavonole

3.4.6. Određivanje klorofila i karotenoida

Određivanje klorofila i karotenoida temelji se na načelu da pri definiranim valnim duljinama svaki od navedenih pigmenata ima apsorpcijski spektar sa apsorpcijskim maksimumima. Spektrofotometrijsko mjerenje provodi se u etanolnom, acetonskom i etil acetatnom ekstraktu uzoraka pri valnim duljinama 649, 664, 470, 663.2, 646.8, 662 i 644 nm (Lichtenthaler i Buschmann., 2001).

Postupak određivanja

Kvantitativno određivanje provodi se spektrofotometrom pri sljedećim valnim duljinama: 649, 664, 644, 662, 646.8 i 663.2 nm, za klorofil a i b (u skladu sa korištenim ekstrakcijskim otapalom) i 470 nm za karotenoide. Pripremljene ekstrakte potrebno je razrijediti direktno u kivetama pomoću otapala koje je korišteno za ekstrakciju. Svako mjerenje provodi se najmanje u paraleli. Kao slijepa proba koristi se otapalo koje je korišteno za ekstrakciju.

Udjeli klorofila a i b te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2001):

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649}$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664}$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13C_a - 97.63 C_b)/209$$

Etil-acetat:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 10.05 A_{662} - 0.766 A_{644}$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 16.37 A_{644} - 3.140 A_{662}$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 1.280C_a - 56.7 C_b)/230$$

80 % aceton:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 21.5 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b)/198$$

gdje je:

A = apsorbanacija,

C_a = klorofil a,

C_b = klorofil b,

C_(x+c) = karotenoidi (ksantofili + karoteni).

3.4.7. Određivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC metoda)

Princip metode:

ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) prema mehanizmu djelovanja spada u HAT (engl. Hydrogen Atom Transfer) metodu koja se temelji na prijenosu atoma vodika, a mjeri se inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis (2- amidinoproionamid)-dihidroklorid (AAPH), pri stalnoj brzini na 37 °C (Prior i sur., 2005).

Priprema uzoraka:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka ORAC metodom, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka (od 100 do 400 puta).

Postupak određivanja:

U jažice mikrolitarske pločice otpipetira se 150 μL otopine fluorescina te 25 μL uzorka, 25 μL slijepe probe (75 mM fosfatni pufer) ili 25 μL otopine standarda Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina) različite koncentracije za izradu baždarnog pravca (3,12 – 103,99 μM). Pločica s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča 30 minuta / 37 °C prije početka mjerenja. Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija pri temperaturi od 37 °C (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25 μL svježe pripremljenog 240 mM AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 minuta. Analiza podataka provodi se automatski pomoću MARS softvera (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Germany). Mjerenje je provedeno u duplikatu, te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom. ORAC vrijednosti antioksidativnog kapaciteta izražavaju se kao ekvivalent Troloksa po litri ($\mu\text{mol TE L}^{-1}$), odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao mikromol troloks ekvivalenta na 100 g suhe tvari ekstrakta ($\mu\text{mol TE } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.e}$).

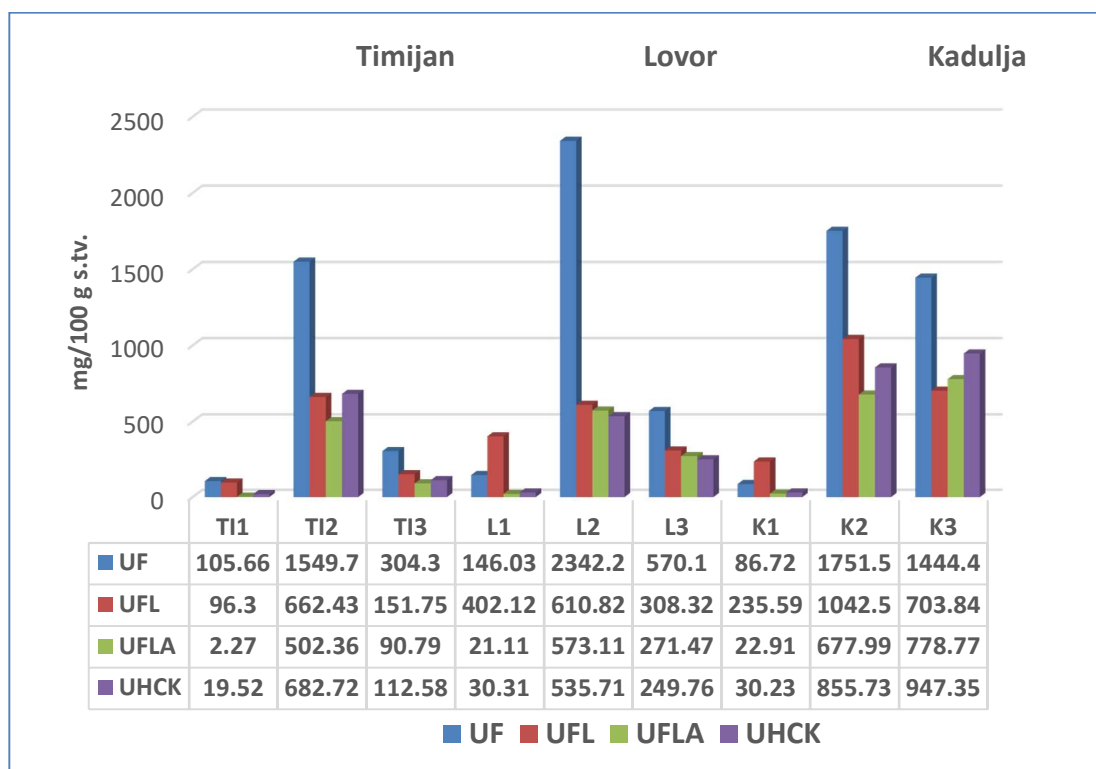
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola te ukupnih karotenoida i klorofila u pripremljenim ekstraktima lista timijana, lovora i kadulje dobivenim sukcesivnom ekstrakcijom sa različitim otapalima uz upotrebu ultrazvuka. Također, u dobivenim ekstraktima je određen antioksidativni kapacitet ORAC metodom.

4.1. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela polifenolnih spojeva

Prema dobivenim rezultatima najveći udio ukupnih fenola (zbroy svih frakcija) određen je u ekstraktima kadulje (3282,68 mg/100 g s.tv.), zatim lovora (3058,29 mg/100 g s.t.) te najmanje u ekstraktima timijana (1959,61 mg/100 g s.tv.), (Slika 11). Usporedbom pojedinačnih frakcija najmanji udio ukupnih fenola određen je u frakciji 1 kadulje (86,72 mg/100 g s.tv.), a najveći u frakciji 2 lovora (2342,16 mg/100 g s.tv.). Općenito, najveći udio ukupnih fenola određen je u frakcijama dobivenim ekstrakcijom sa 80% acetonom (frakcija 2), a najmanji u frakcijama ekstrahiranim heksanom i otopljenim u etil acetatu (frakcija 1). Ukupni flavonoidi, flavonoli te ukupne hidroksicimetne kiseline također pokazuju isti trend kao i ukupni fenoli u navedenim biljnim vrstama. Najmanji udio ukupnih flavonoida (96,30 mg/100 g s.tv.), flavanola (2,27 mg/100 g s.tv.) i hidroksicimetnih kiselina (19,52 mg/100 g s.tv.) određen je u frakciji 1 timijana, a najveći udio ukupnih flavonoida (1042,51 mg/100 g s.tv.) i flavanola (778,77 mg/100 g s.tv.) u frakciji 2 kadulje odnosno hidroksicimetnih kiselina (947.35 mg/100g s.tv.) u kadulji, ali u frakciji 3. Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti da se maseni udjeli svih fenolnih spojeva nisu značajno razlikovali u acetonskim i etanolnim ekstraktima kadulje za razliku od timijana i lovora. Budući da su polifenoli uglavnom polarni spojevi jako polarna otapala (npr. voda) i nepolarna otapala (npr. etil acetat i heksan) nisu pogodna za njihovu ekstrakciju. Upotreba vode u kombinaciji s drugim organskim otapalima stvara umjereno polarni medij čime se postižu optimalni uvjeti za ekstrakciju fenola iz biljnih materijala (Rafiee i sur., 2011). Pregledom literature utvrđeno je kako se za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka kao otapala uglavnom koriste mješavine metanola i etanola s vodom i mješavine acetona i vode (Wang i sur., 2004). Wang i suradnici (2004) su istraživali utjecaj različitih koncentracija otopina metanola, etanola i acetona na ekstrakciju fenolnih spojeva iz kadulje, timijana, bosiljka i lavande pri čemu su veći udjeli izoliranih fenolnih spojeva dobiveni ekstrakcijom vodenim otopinama alkohola, odnosno etanola. I u istraživanju Dent i suradnika (2013) ekstrakcijom kadulje acetonom, etanolom i vodom pri različitim temperaturama najviše ekstrahiranih polifenola je bilo u frakciji sa etanolom, a zatim

u frakciji s acetonom. Također, veći prinosi fenolnih spojeva su bili i u listu lovora kad je provedena ekstrakcija etanolom nego acetonom (Rival i sur., 2019).



Slika 11. Maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima listova timijana (TI), lovora (L) i kadulje (K)

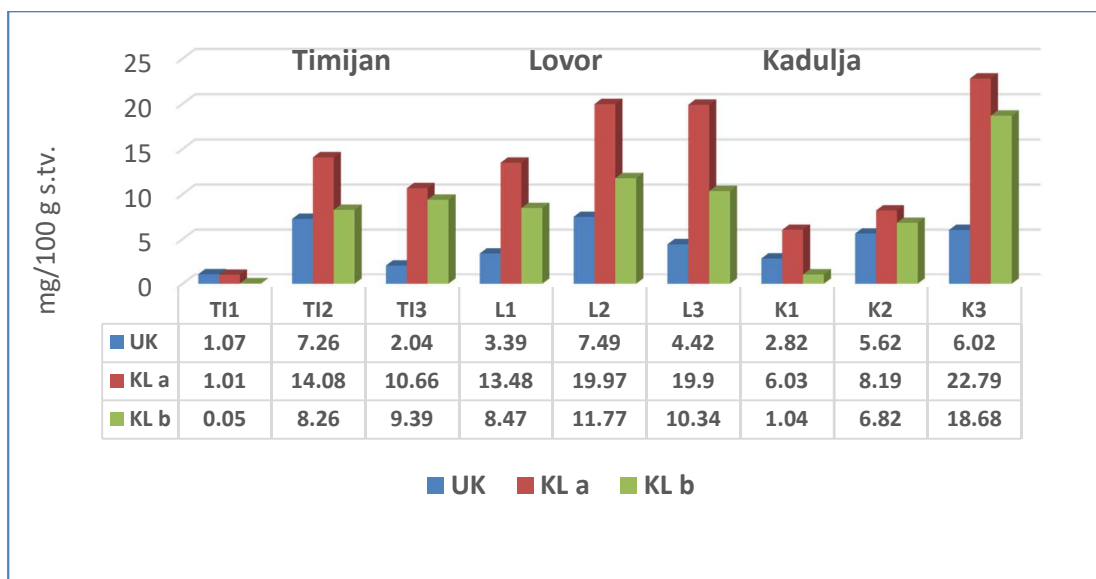
* 1 - ekstrakti prve frakcije ekstrahirani heksanom i otopljeni u etil-acetatu; 2 - ekstrakti druge frakcije ekstrahirani 80% acetonom; 3 - ekstrakti treće frakcije ekstrahirani 96% etanolom; UF -ukupni fenoli; UFL – ukupni flavonoidi; UFLA – ukupni flavone; UHCK – ukupne hidroksicimetne kiseline

4.2. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela kloroplastnih pigmenta (ukupnih karotenoida, klorofila a i b) u ekstraktima listova timijana, kadulje i lovora

Na slici 12. prikazani su rezultati ukupnih karotenoida, klorofila a i b u ekstraktima listova timijana, lovora i kadulje. Prema dobivenim rezultatima najveći udio ukupnih karotenoida (zbroj svih frakcija) određen je u ekstraktima lovora (15,3 mg/100 g s.tv.), zatim kadulje (14,46 mg/100 g s.tv.) te najmanje u ekstraktima timijana (10,37 mg/100 g s.tv.). Najmanji maseni udio ukupnih karotenoida određen je u timijanu frakcije 1 (1,07 mg/100 g s.tv.), a najveći u lovoru frakcije 2 (7,49 mg/100 g s.tv.). Neznatno manja koncentracija ukupnih karotenoida određena je u frakciji 2 timijana (7,26 mg/100 g s.tv). Kao i kod fenolnih spojeva, najveći udio ukupnih karotenoida određen je u frakcijama dobivenim ekstrakcijom sa 80% acetonom (frakcija 2), a najmanji u frakcijama ekstrahiranim heksanom i otopljenim u etil acetatu (frakcija 1). Za razliku od ekstrakata timijana i lovora, kod kadulje nije bila značajna

razlika u udjelima ukupnih karotenoida u acetonskoj i etanolnoj frakciji. Prisutnost različitih tipova karotenoidnih spojeva s različitom polarnosti otežava njihovu ekstrakciju jer karotenoidi pokazuju različit afinitet prema ekstrakcijskim otapalima (Kopec i sur., 2012) Zato izbor ekstrakcijskog otapala ovisi o analiziranoj biljnoj vrsti i sastavu karotenoida (Paradiso i sur., 2020). Primjerice, za bolju ekstrakciju ksantofila koriste se polarna otapala kao što su alkoholi, aceton i smjese aceton/voda, dok se karoteni bolje ekstrahiraju nepolarnim otapalima poput heksana, petrol-etera, tetrahidrofurana (Saini i Keum, 2018). U istraživanju Varaprasad i suradnika (2019) ispitivao se utjecaj različitih ekstrakcijskih otapala na izolaciju ukupnih karotenoida iz zelenih algi te se aceton pokazao kao najučinkovitije otapalo.

Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je kako je najveći udio ukupnih klorofila (zbroy svih frakcija) određen u ekstraktima lovora (83,93 mg/100 g s.tv.), zatim kadulje (63,55 mg/100 g s.tv.) te najmanje u ekstraktima timijana (43,45 mg/100 g s.tv.), (slika 13.). Pri tome, ekstrakt lovora sadržavao je najveći udio oba tipa klorofila, od čega više klorofila a (53,35 mg/100 g s.tv.) nego klorofila b (30,58 mg/100 g s.tv.). Najmanji maseni udio klorofila a određen je u prvoj frakciji timijana (1,01 mg/100 g s.tv.), a najveći u trećoj frakciji kadulje (22,79 mg/100 g s.tv.). Zanimljivo manja koncentracija klorofila određena je u frakcijama 2 i 3 lovora (19,97 i 19,9 mg/100 g s.tv.). Kao i klorofila a, klorofila b je najmanje određeno u frakciji 1 timijana (0,05 mg/100 g s.tv.), a najviše u frakciji 3 kadulje (18,68 mg/100 g s.tv.). Kao najbolje otapalo za ekstrakciju klorofila pokazao se etanol kojim je ekstrahirano najviše klorofila a i b (frakcija 3). S druge strane, najmanje klorofila je određeno u frakcijama ekstrahiranim heksanom i otopljenim u etil-acetatu (frakcija 1). Klorofil a i klorofil b su polarni spojevi zbog svoje građe, a klorofil b je polarniji zbog aldehidne grupe na mjestu gdje klorofil a ima metilnu grupu (Pavia i sur., 1999). U istraživanju El- Mouhty i El- Nagaar (2014) istraživao se utjecaj otapala na ekstrakciju klorofila a i b iz peršina također se etanol pokazao kao najbolje otapalo za izolaciju klorofila.

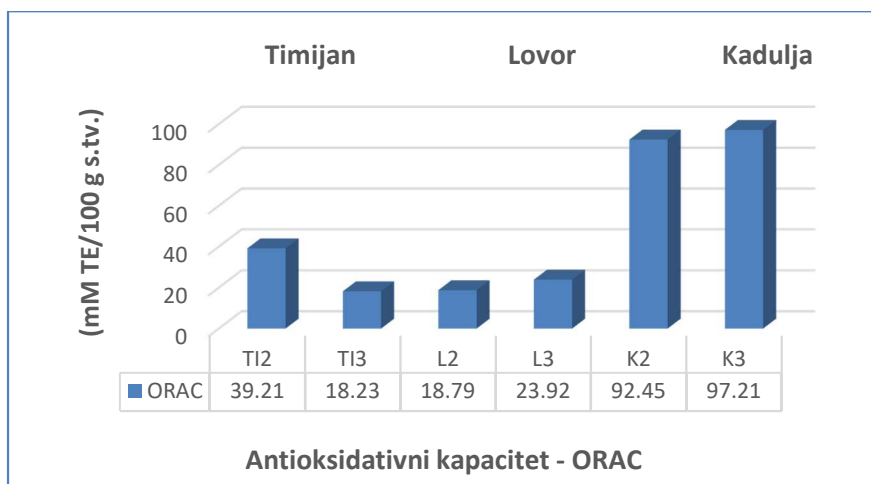


Slika 12. Maseni udjeli ukupnih karotenoida, klorofila a i b u ekstraktima listova timijana (TI), lovora (L) i kadulje (K)

* 1 - ekstrakti prve frakcije ekstrahirani heksanom I otopljeni u etil-acetatu; 2 - ekstrakti druge frakcije ekstrahirani 80% acetonom; 3 - ekstrakti treće frakcije ekstrahirani 96% etanolom; UK - ukupni karotenoidi; KL a-klorofil a; KL b – klorofil b

4.3. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u ekstraktima timijana, kadulje i lovora

Rezultati kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u ekstraktima listova timijana, lovora i kadulje frakcije 2 i 3 prikazani su na Slici 13. Usporedbom svih analiziranih ekstrakata najveće ORAC vrijednosti određene su u ekstraktima listova kadulje. Najmanji kapacitet apsorpcije kisikovih radikala određen je u ekstraktu timijana frakcije 2 (18,23 mM TE/100 g s.tv.), a najveći u etanolnim ekstraktima kadulje frakcije 3 (97,21 mM TE/100 g s.tv.). Za razliku od timijana gdje je veći kapacitet apsorpcije kisikovih radikala bio u acetonskoj frakciji (39,21 mM TE/100 g s.tv.), kod kadulje i lovora ORAC vrijednosti se nisu značajno razlikovale u acetonskoj i etanolnoj frakciji ekstrakata listova. Prema rezultatima istraživanja Bhagwat i Haytowitz (2010) ORAC vrijednosti timijana i kadulje su bile 27,426 i 32,004 mM TE/100 g s.tv. što je djelomično u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Usporede li se rezultati ukupnih fenola sa ORAC vrijednostima pripadajućih frakcija može se zaključiti kako veće vrijednosti kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala imaju frakcije sa većim udjelom fenolnih spojeva (slika 11 i slika 13).



Slika 13. Kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) u ekstraktima listova timijana (TI), lovora (L) i kadulje (K)

*2 - ekstrakti druge frakcije ekstrahirani 80% acetonom; 3 - ekstrakti treće frakcije ekstrahirani 96% etanolom; TI- timijan, L- lovor, K- kadulja

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u okviru provedenog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

- Usporedbom selektiranih biljnih vrsta najveći maseni udio fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina) određen je u ekstraktima kadulje, a najmanje u ekstraktima timijana
- Bolja učinkovitost izolacije svih skupina fenolnih spojeva iz listova timijana i lovora sukcesivnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom ostvarena je uz primjenu 80% acetona kao otapala dok se udjeli fenolnih spojeva nisu značajno razlikovali u acetonskim i etanolnim ekstraktima listova kadulje
- Najmanji udio izoliranih fenolnih spojeva je bio u frakciji ekstrahiranoj heksanom i otopljenoj u etil acetatu s obzirom na polarnost otapala
- Najveći maseni udio ukupnih karotenoida I klorofila određen je u ekstraktima lista lovora, a najmanje u ekstraktima lista timijana, a veći je ekstrakcijski kapacitet izolacije karotenoida kada se kao otapalo koristi 80% aceton, a kod klorofila 80% etanol
- Najveći kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) određen je u ekstraktima listova kadulje, dok su u timijanu i lovoru značajno manje ORAC vrijednosti
- Listovi timijana, lovora i kadulje su dobar izvor bioaktivnih spojeva polifenola, karotenoida i klorofila, a visok kapacitet apsorpcije kisikovih radikala dokazuje visok potencijal ovih biljnih vrsta za primjenu u prehrambenoj industriji

6. LITERATURA

1. AOAC (1984) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington,DC.
2. Arena C., Vitale L., Virzo de Santo A. (2008) Photosynthesis and photoprotective strategies in *Laurus nobilis* L. and *Quercus ilex* L. under summer drought and winter cold. *Plant Biosystem- An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **142**(3): 472-479.
2. Attokaran M. (2013) Natural Food Flavours and Colorants, 2. izd., Wiley& Blackwell. str. 74-77.
3. Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**: 426–436.g
4. Berim A., Yahyaa M., Isaacson T., Marzouk S., Bar E., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E., Ibdah M. (2015) Isolation and Functional Characterization of Carotenoid Cleavage Dioxygenase-1 from *Laurus nobilis* L. (Bay Laurel) Fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* **63**(37): 8275-8282.
5. Bhagwat S. i Haytowitz D. B. (2010) USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected Foods, 2. izd., Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center (BHNRC), Agricultural Research Service (ARS), U.S. Department of Agriculture (USDA) str. 10-15. <<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata> > Pristupljeno: 11. 09.2020.
6. Caputo L., Nazzaro F., Souza L. F., Aliberta L., De Martino L., Fratianni, F., Coppola R., De Feo V. (2017) *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. *Molecules* **22**(6): 930.
7. Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**(3): 178-182.
8. Chizzola R. Michitsch H., Franz C. (2008) Antioxidative Properties of *Thymus vulgaris* Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **56**: 6897–6904.
9. Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N. (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. U: Plant Secondary Metabolites, Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, 1. izd., Crozier A., Clifford M. N., Ashihara H., ur., Blackwell Publishing, Ltd. str. 1-9.

10. Daly T., Jiwan M. A., O'Brien N., Aherne S. A. Carotenoid Content of Commonly Consumed Herbs and Assessment of Their Bioaccessibility Using an In Vitro Digestion Model. *Plant Foods for Human Nutrition* **65**(2): 164–169.
11. Dauqan E. M. A., Abdullah A. (2017) Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* **5**(02): 017-022.
12. Dent M., Dragović- Uzelac V., Penić M., Brnić M., Bosiljkov T., Levaj B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. Polyphenols from Dalmatian Wild Sage, *Food Technology and Biotechnology* **51**(1): 84–91.
13. Dent M., Bursać Kovačević D., Bosiljkov T., Dragović- Uzelac V. (2017) Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.). *Croatia Chemical Acta* **90**(3): 451-459.
14. Derwich E., Benziane Z., Boukir A. (2009) Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**(4): 3818-3824.
15. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. (2016) Essential Oils'Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A critical Review. *Medicines* **3**(4): 25.
16. Dixon R. A. I Passinetti G. M. (2010) Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. *Plant Physiology* **154**: 453-457.
17. Drmić H. Jambrak Režek A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* **2**(2): 22-33.
18. Dudaš S. i Venier L. (2009) Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L. *Glasnik zaštite bilja*, **32**(6): 46-54.
19. El- Mouhty N. R. A. i El- Nagaar A. Y. (2014) Extraction of chlorophyll and carotene from irradiate parsley plant. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* **3**(1): 8522-8527.
20. El-Qudah J. M. (2014) Contents of Chlorophyll and Carotenoid Pigments in Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *World Applied Sciences Journal* **29**(10): 1277-1281.
21. González de Peredo A. V., Vázquez-Espinosa M., Espada-Bellido E., Ferreira-González M., Amores-Arocha A., Palma M., F. Barbero G. and Jiménez-Cantizano A. (2019) Alternative Ultrasound-Assisted Method for the Extraction of the Bioactive Compounds Present in Myrtle (*Myrtus communis* L.). *Molecules* **24**: 882.
22. Gross, J. (1991) Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids, 1. izd., Springer Science+Business Media, New York str. 3-32.

23. Hamdy Roby M. H., Sarhana M. A., Selima K. A.-H., Khalel K. I. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* **43**: 827-831.
24. Howard L.R., Clark J.R., Brownmiller C., (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**(12): 1238-1247.
25. Huang Z., Liu Y., Qi G., Brand D., Zhenga S. G. (2018) Role of Vitamin A in the Immune System. *Journal of Clinical Medicine* **7**(9): 258.
26. Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835.
27. Imitiaz M., Hussain G., Anwar H. (2018) Antioxidants from Natural Sources. U: Atioxidants in Food and Its Applications, Shalaby E., ur., IntechOpen. <<https://www.intechopen.com/books/antioxidants-in-foods-and-its-applications>> Pristupljeno: 08.09.2020.
28. Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H., Yano M. (2004) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* **134**: 824-837.
29. Kaurinovic B., Vastag D. (2019) Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. U: Atioxidants in Food and Its Applications, Shalaby E., ur., IntechOpen. link: <<https://www.intechopen.com/books/antioxidants-in-foods-and-its-applications>> pristupljeno: 10.09.2020.
30. Kazazić S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiva Higijene i Rada Toksikologija* **55**(4): 279-290.
31. Khan M. K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.- S., Dangles O., Chemat F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* **119**: 851-858.
32. Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. (2013) Tehniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**(2): 2328-2375.
33. Kopec R. E., Cooperstone J.L., Cichon M. J., Schwartz S. J. (2012) Analysis Methods of Carotenoids. U: Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, 1. izd., Xu Z. i Howard L. R., ur., Wiley-Blackwell, Oxford, UK str. 105–148.
34. Kuštrak D. (2005) Farmakognozija: Fitofarmacija, Golden Marketing-Tehnička Knjiga, Zagreb, str. 278-309.
35. Karamali Khanbabaee K. i van Ree T. (2001) Tannins: Classification and Definition. *The*

- Royal Society of Chemistry* **18**: 641-649.
36. Khedher M. R. B., Khedher S. B., Chaieb I., Tounsi S., Hammami M. (2017) Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *EXCLI Journal* **16**: 160-173.
 37. Lanfer Marquez U. M. i Borrmann D. (2009) Chlorophylls. U: Handbook of Natural Colorant, Bechtold T. i Mussak R., ur., John Wiley & Sons, Ltd. str. 243-252
 38. Lichtenthaler H. K. i Buschmann C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* **1**(1): F3-4.
 39. Marhuenda-Muñoz M., Hurtado-Barroso S., Tresserra-Rimbau A., Lamuela-Raventós R. M. (2019) A review of factors that affect carotenoid concentrations in human plasma: differences between Mediterranean and Northern diets. *European Journal of Clinical Nutrition* **72**: 18–25.
 40. Mithad M. (2019) Lovorov list (*Laurus nobilis*)
<<http://ljubusaci.com/2019/04/17/lovorov-listlaurus-nobilis/>> Pristupljeno: 10.09.2020.
 41. Murillo- Amador B., Nieto- Garibay A., Villegas- Espinoza J. A., Troyo- Diéguez E., Ramírez- Serrano R., Córdoba- Matson M. V. (2014) Evaluating the best model for measuring chlorophyll in sage leaves in the field using the SPAD- 502 meter. *Mitteilungen Klosterneuburg* **64**(6): 84-100.
 42. Nielsen J. A., Frew R. D., Whigram P. A., Callaway R. M., Dickinson K. J. M. (2015) Germination and growth responses of co-occurring grass species to soil from under invasive *Thymus vulgaris*. *Allelopathy Journal* **35** (1): 139-152.
 43. Nikolić, T. (2015) Flora Croatica baza podataka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. < <http://hirc.botanic.hr/fcd>> pristupljeno: 10.9.2020.
 44. Ono M., Takeshima M., Nakano S. (2015) Chapter Six- Mechanism of the Anticancer Effect of Lycopene (Tetraterpenoids). *The Enzymes* **37**:139-166.
 45. Paradiso i sur (2020) Setup of an Extraction Method for the Analysis of Carotenoids in Microgreens. *Foods* **9**(459): 1-12.
 46. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Engel R. G. (1999) Isolation of Chlorophyll and Carotenoid Pigments from Spinach. U: Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Microscale Approach, 3. izd., Saunders College Publishing, NY str. 1-7.
 47. Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290-4302.

48. Rafiee Z., Jafari S. M., Alami M., Khomeiri M. (2011) Microwave- assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves: a comparison with maceration. *Journal of Animal and Plant Science* **21**: 738-745.
49. Ren, Y-Z., Wu, Z-L, Franke, M., Braeutigam, P., Ondruschka, B., Comeskey, D.J., King, P.M. (2013) Sonoelectrochemical degradation of phenol in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry* **20**: 715-721.
50. Rival H., Yulianti S., Chandra B. (2019) Qualitative and Quantitative Analysis of Hexane, Acetone Ethanol and Water Extract from Bay Leaves (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). *The Pharmaceutical and Chemical Journal* **6**(3): 13-20.
51. Roca M., Chen K., Pérez-Gálvez A. (2016) Chlorophyll. U: Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Colour, 1. izd., Reinhold C. i. Schweiggert R. M., ur., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 295 str. 126-149.
52. Rodriguez-Amaya, D. B. (2016) Food carotenoids: chemistry, biology and technology, 1. izd., IFT Press series, John Wiley & Sons, Ltd., UK str. 1-35.
53. Roginsky V. i Lissi F. A. (2005) Review of methods to determine chain- breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* **92**(2): 235-254.
54. Saibabu V., Fatima Z., Luqman Ahmad Khan L. A., Hameed S. (2015) Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* **1**: 1-10.
55. Saini R.K. i Keum Y.S. (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry* **240**: 90–103.
56. Satyal P, Murray B. L., McFeeters R. L., Setzer W. N. (2016) Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods* **5**(4): 70.
57. Shortle E., O'Grady M. N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti- oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98**(4): 828- 834.
58. Sies H. i Stahl W. (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition* **62**: 1315S–1321S.
59. Spiridon J., Bodirlau R., Teaca C.-A. (2011) Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology* **6**(3): 388-396.
60. Statham R. (2016) Thyme: Another wonder herb from Hippocrates' medicine cabinet, genevabusinessnews < <https://www.gbnews.ch/thyme/>> Pristupljeno: 15.7.2020.
61. Taiz L. i Zeiger E. (2010) Plant Physiology, 5. izd., Sinauer, Inc., US str.164- 172.

62. Trowbridge Flippone P. (2019) Sage History, Uses and Recipes. <<https://www.thespruceeats.com/history-of-sage-1807657>> Pristupljeno 15.7.2020.
63. Varaprasad D. A., Raga Sudha N., S. Nazaneen Parveen, Chandrasekhar T. (2019) Effect of various solvents on chlorophyll and carotenoid extraction in green algae: *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. *Annals of Plant and Soil Research* **21**(4): 341-345.
64. Vinatoru M. (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry* **8**: 303-313.
65. Vladimir- Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Babac M. (2012) Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. U: *Phytochemicals as Nutraceuticals-Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, 1. izd., Venketeshwer R., ur., IntechOpen. <<https://www.intechopen.com/books/antioxidants-in-foods-and-its-applications>> Pristupljeno: 08.09.2020.
66. Wang H., Provan G., Helliwel K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry* **87**: 307- 311.
67. Zantar S., El Garrouj D., Pagán R., Chabi M., Laglaoui A., Bakkali M., Hassani Zerrouk M. (2015) Effect of Harvest Time on Yield, Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* Essential Oils. *European Journal of Medicinal Plants* **8**(2): 69-77.
68. Zhang Q. W., Lin L.-G., Ye W.-C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **13**(20): 1-26.
69. Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Pisarev D. I., Malyutina A. Y., Boyko N. N. (2017) Studying the polyphenolic structure of *Laurus Nobilis* L. leaves. *INDO American journal of pharmaceutical sciences* **4**(9): 3066- 3074.
70. E brojevi (2007), Udruga za demokratsko društvo <<https://e-brojevi.udd.hr/140.htm>> Pristupljeno 07.09.2020.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ira Renko

ime i prezime studenta