

# Određivanje bioaktivnog potencijala trave ive (*Teucrium montanum* L.) primjenom ekstrakcije mikrovalovima i subkritičnom vodom

---

Grizelj, Diana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:210589>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Diana Grizelj**

7598/PT

**ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG POTENCIJALA TRAVE IVE**  
**(*Teucrium montanum* L.) PRIMJENOM EKSTRAKCIJE**  
**MIKROVALOVIMA I SUBKRITIČNOM VODOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“ (IP-2019-04-5879), koji je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost

**Mentor:** Prof.dr.sc. Draženka Komes

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambenu tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ODREĐIVANJE BIOAKTIVNOG POTENCIJALA TRAVE IVE (*Teucrium montanum* L.) PRIMJENOM EKSTRAKCIJE MIKROVALOVIMA I SUBKRITIČNOM VODOM

Diana Grizelj, 7598/PT

**Sažetak:** Trava iva (*Teucrium montanum* L.) biljna je vrsta poznata po izraženim antioksidacijskim, protuupalnim i antimikrobnim svojstvima koja su rezultat bogatog bioaktivnog sastava u kojem dominiraju polifenolni spojevi. Cilj ovog rada bio je usporediti udio polifenolnih spojeva i antioksidacijska svojstva ekstrakata trave ive dobivenih primjenom 2 metode; ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE), uz varijaciju temperature, duljine trajanja ekstrakcije i omjera uzorak:otapalo. Primjenom spektrofotometrijskih metoda dobivenim ekstraktima određen je udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH metode), dok su pojedinačni polifenolni spojevi određeni primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-PDA). SWE se pokazala puno učinkovitija u izdvajanju polifenolnih spojeva i SWE ekstrakt (200 °C, 0,01 i 15 min) karakteriziran je najvišim udjelom ukupnih polifenola (84,49 mg GAE/s.tv. uzorka) i najvećim antioksidacijskim kapacitetom (ABTS: 457,92 µm Trolox-a/g s.tv. uzorka; DPPH: 387,03 µm Trolox-a/g s.tv. uzorka). Nastupljeniji polifenolni spojevi u travi ivi su feniltanoidni glikozidi verbaskozid i ehinakoamid.

**Ključne riječi:** antioksidacijski kapacitet, bioaktivni potencijal, ekstrakcija, polifenolni spojevi, trava iva

**Rad sadrži:** 31 stranicu, 12 slika, 36 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Prof. dr. sc. Draženka Komes

**Pomoć pri izradi:** Ana Mandura mag. ing.

**Datum obrane:** 16.09.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Quality Control**  
**Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry**

**Scientific area: Biotechnical Science**  
**Scientific field: Food Technology**

### **DETERMINATION OF BIOACTIVE POTENTIAL OF MOUNTAIN GERMANDER (*Teucrium montanum* L.) BY APPLYING MICROWAVE AND SUBCRITICAL WATER EXTRACTION**

Diana Grizelj, 7598/PT

**Abstract:** Mountain germander (*Teucrium montanum* L.) is a plant species known for its pronounced antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties resulting from its rich bioactive composition dominated by polyphenol compounds. The aim of this study was to compare the polyphenol compounds content and antioxidant properties of mountain germander extracts obtained using 2 methods; microwave assisted extraction (MAE) and subcritical water extraction (SWE), with temperature variation, duration of extraction and sample ratio:solvent. The proportion of total polyphenols and antioxidant capacity (ABTS and DPPH methods) were determined using spectrophotometric methods obtained by extracts, while individual polyphenol compounds were determined using high performance liquid chromatography (HPLC-PDA). SWE has proven to be much more effective in separating polyphenol compounds and SWE extract (200 °C, 0.01 and 15 min) is characterised by the highest content of total polyphenols (84.49 mg GAE/dmb) and the highest antioxidant capacity (ABTS: 457,92 µm of Trolox/g dmb; DPPH: 387.03 µm of Trolox/g dmb). The most prominent polyphenol compounds in mountain germander are phenyltanoid glycosides verbascoside and echinacoside.

**Keywords:** antioxidant properties, bioactive potential, extraction, polyphenole compounds, mountain germander

**Thesis contains:** 31 pages, 12 figures, 36 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic 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:** Ana Mandura mag. ing.

**Defence date:** 16.09.2021.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Trava iva ( <i>Teucrium montanum</i> L.) .....	2
2.1.1. Bioaktivni potencijal trave ive .....	3
2.2. Metode ekstrakcije bioaktivnih komponenata.....	4
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	5
2.2.2. Ekstrakcija subkritičnom vodom .....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	8
3.1. Materijal.....	8
3.1.1. Uzorak.....	8
3.1.2. Kemikalije .....	8
3.1.3. Aparatura i pribor .....	9
3.2. Metode .....	10
3.2.1. Određivanje suhe tvari.....	10
3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	11
3.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom .....	12
3.2.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....	12
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta .....	13
3.2.5.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	13
3.2.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	15
3.2.6. Određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ekstraktima primjenom HPLC metode .....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola u ekstraktima.....	18
4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata .....	21
4.3. Određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ekstraktima primjenom HPLC metode.....	25
5. ZAKLJUČCI .....	27
6. LITERATURA.....	28

## 1. UVOD

Sukladno suvremenom načinu života u kojem potrošači postaju svjesniji povezanosti zdravlja i kvalitete hrane koju konzumiraju, prehrambena industrija također sve više teži prirodnim sastojcima bogatog bioaktivnog sastava. Među brojnim poželjnim bioaktivnim sastojcima prirodnoga podrijetla, posebno se ističu polifenolni spojevi, zbog dokazanih izraženih antioksidacijskih svojstava, uz koje se vezuju i razni drugi pozitivni zdravstveni učinci poput antimikrobnog, protupalnog, hepatoprotektivnog, antikancerogenog i antialergijskog (Jovanović i sur., 2017).

*Teucrium* vrste imaju dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini, a prva znanstveni zapisi o travi ivi datiraju još prije nekoliko desetljeća kada je skupina bugarskih znanstvenika istraživala strukturu i stereokemiju novoizoliranih furaniodnih diterpena klerodanskih i neoklerodanskih vrsta iz trave ive. Izvijestili su o izolaciji i strukturi montanin-A i montanin-B (Malakov i sur., 1978a), montanin-C (Malakov i sur., 1978b), montanin-D (Malakov i sur., 1978c), montanin-E i montanin-F (Papanov i sur., 1983) i montanin-H (Malakov i sur., 1992). *Teucrium* rod je najbrojniji prirodni izvor furaniodnih diterpena pa su stoga *Teucrium* vrste prihvaćene kao kemotaksonomski marker za neoklerodane (Hasani-Ran i sur. 2010).

Veliki broj polifenolnih spojeva znači i veliki broj njihovih različitih kemijskih struktura što predstavlja izazov kod odabira metode ekstrakcije jer nije moguće jednom metodom ekstrahirati sve ciljane polifenolne spojeve iz jednog biljnog uzorka (Bucić-Kojić, 2011). Premda se u ekstrakciji polifenola najčešće koriste konvencionalne ekstrakcijske metode, a koje karakterizira primjena otapala i/ili povišene temperature, velike količine utrošenog otapala, niža ekonomičnost i relativna degradacije termolabilnih komponenti, što su razlozi koji potiču na minimiziranje navedenih učinaka kroz potencijalnu primjenu inovativnih ekstrakcijskih metoda. U tom kontekstu sve više se primjenju ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija eutektičkim otapalima, ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem, superkrična CO<sub>2</sub> ekstrakcija te ekstrakcija vodom u subkričnom stanju (Belwal i sur., 2020).

Cilj ovog rada je odrediti bioaktivni potencijal ekstrakata trave ive, *Teucrium montanum* L., dobivenih inovativnim metodama; ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima i ekstrakcijom subkričnom vodom, uz varijaciju uvjeta ekstrakcije (temperatura, duljina trajanja i omjer uzorak/otapalo). Dobivenim ekstraktima odredit će se udio ukupnih

polifenola i antioksidacijski kapacitet primjenom spektrofotometrijskih metoda, dok će se dominantni pojedinačni polifenolni spojevi odrediti HPLC metodom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Trava iva (*Teucrium montanum* L.)

Trava iva (Slika 1) pripada rodu *Teucrium* koji sadrži preko 300 vrsta biljaka rasprostranjenih po cijelom svijetu te je jedan od najvećih rodova porodice *Lamiaceae*. Mediteransko područje čini centar biljne raznolikosti s oko 90% ukupnog broja *Teucrium* vrsta cijeloga svijeta, pri čemu najpoznatije europske i azijske vrste (*Teucrium chamaedrys*, *T. montanum* i *T. polium*) imaju dugu tradiciju uporabe u balkanskim zemljama, bilo u sastavu biljnih infuzija ili različitih ljekovitih pripravaka (Stanković, 2020). *Teucrium montanum*, poznata i pod nazivima gorski cmilj i dubčac, je višegodišnja zeljasta biljka visine od 5 do 30 cm. Stabljike su djelomično uzdignute, tanke i veoma razgranate. Cvjetovi su blijedožućkasti, grupirani na vrhovima grana. Listovi su eliptičnog oblika i prema vrhu postupno suženi, dlakavi samo s naličja. Raste na toplim vapnenačkim stijenama, suhim pašnjacima i livandama. Nastanjuje borove šume u brdskom i planinskom pojasu na nadmorskoj vini od 30 do 2000 m. Cvjeta od lipnja do rujna, a bere se i suši samo nadzemni dio biljke. Aromatična je biljka specifičnog mirisa te izuzetno gorkog okusa (Stanković, 2020).

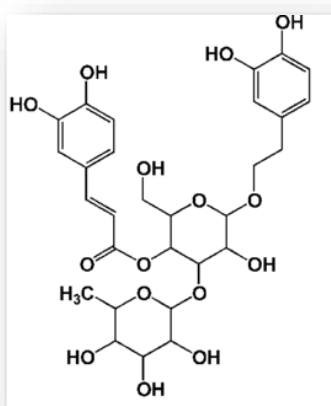


**Slika 1.** *Teucrium montanum* L. (Anonymous 1, 2021)

### 2.1.1. Bioaktivni potencijal trave ive

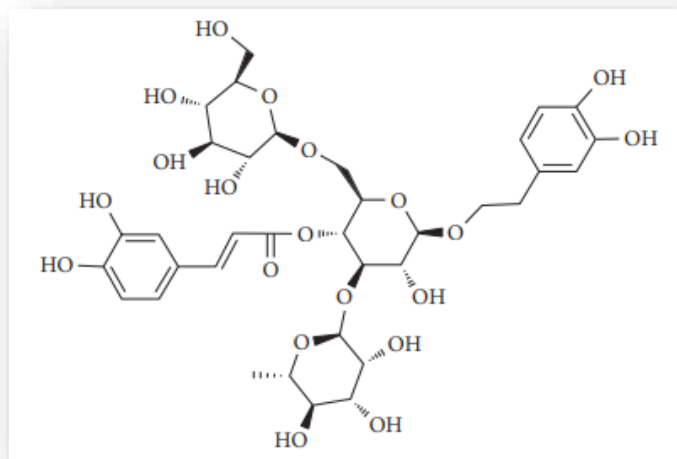
Stoljećima se *Teucrium* vrste, uključujući *Teucrium montanum* L., koriste u različitim biljnim pripravcima za ublažavanje određenih zdravstvenih tegoba koje su se tek unatrag nekoliko desetljeća počele povezivati s njezinim kemijskim sastavom, zahvaljujući brojnim istraživanjima koja se provode. Istraživanja su pokazala da je trava iva bogata polifenolnim spojevima koji pokazuju visoku biološku aktivnost i antioksidacijsko djelovanje te da postoji značajna korelacija između antioksidacijske aktivnosti i udjela polifenola kao i da kvantifikacija sekundanih metabolita, i antioksidacijska aktivnost, ovise o dijelu i fenološkoj fazi biljke iz kojega se ekstrahiraju te o samom staništu biljke (Stanković, 2020).

U radu Tumbas i suradnika (2004) navedeno je kako je udio polifenola u ekstraktima funkcija polarosti korištenih otapala. Flavonoidi su najzastupljenija grupa spojeva u ovoj biljci (sadrži ih čak 17), među kojima su najzastupljeniji epikatehin, naringin, rutin i drugi, a pojavljuju se i seskviterpeni te kalij i natrij (Stanković, 2020). Gentizinska je reprezentativna kiselina trave ive, a ista sadrži i galnu, siriginsku, klorogensku, ferulinsku i kafeinsku kiselinu (Stanković, 2020). Trava iva sadrži i dva glikozida kafeinske kiseline iz skupine fenilpropanoida, verbaskozid (Slika 2) i ehinakozid (Slika 3), čiji su vrlo važan utjecaj i značenje za organizam opisali Alipieva i suradnici (2014) te Zhang i suradnici (2017). Polifenolni spojevi poznati su kao hvatači slobodnih radikala snažne antioksidacijske aktivnosti koja je rezultat prisutnosti, rasporeda i broja hidoksilnih grupa (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).



**Slika 2.** Kemijska struktura verbaskozida (Anonymous 2, 2011)





**Slika 3.** Kemijska struktura ehinakozida (Zhang i sur. 2017)

*Teucrium montanum* L. posjeduje antibakterijsko, protuupalno, protugljivično i antioksidacijsko djelovanje (Tumbas i sur., 2004) zbog čega se od davnina koristi kao biljni lijek za tegobe želuca i jetre, kao diuretik i analgetik, za pročišćavanje žučnih kanala i krvi, jačanje imunološkog sustava pa je opravdana narodna izreka: "trava iva od mrtva pravi živa" (Stanković, 2020).

## 2.2. Metode ekstrakcije bioaktivnih komponenata

Ekstrakcija je metoda separacije topljivog materijala od netopljivog ostatka, koji može biti krutina ili tekućina, koristeći različita otapala koja se ne miješaju (Bagade i Patil, 2019). Najčešći čimbenici koji utječu na učinkovitost i prinose ekstrakcije su svojstva matriksa biljnog dijela, afinitet otapala, temperatura, tlak i vrijeme (Azmir i sur., 2013). Primjeni bioaktivnih sastojaka u različitim komercijalnim sektorima, poput farmaceutske industrije, kemijske i prehrambene, prethodi njihova identifikacija i kvantifikacija, a shodno tome onda se traži i najprikladnija metoda za njihovu ekstrakciju iz biljnih materijala (Azmir i sur., 2013). Uzimajući u obzir kompleksnost biljnih matriksa iz kojih se izdvajaju bioaktivne komponente njihova ekstrakcija je svakako izazov za dobivanje visokokvalitetnog ekstrakta (Giacometti i sur. 2018). Sve tehnike ekstrakcije imaju neke zajedničke ciljeve poput: izdvojiti pojedine značajne bioaktivne komponente iz različitih dijelova biljke, prevesti bioaktivne komponente u oblik prikladniji za detekciju i identifikaciju, povećati selektivnost i

osjetljivost metode te osigurati njezinu ponovljivost koja neće ovisiti o razlikama matrice uzoraka (Azmir i sur., 2013).

Ekstrakcijske metode se dijele na konvencionalne i inovativne (nekonvencionalne) metode. Konvencionalne metode; maceracija, infuzija, dekokcija, perkolacija i Soxhlet ekstrakcija, temelje se na ekstrakcijskom kapacitetu različitih otapala uz primjenu topline i/ili miješanja. Ekstrakcijska učinkovitost bilo koje od konvencionalnih metoda uglavnom ovisi o izboru otapala (Azmir i sur., 2013). Cilj ovih metoda je povećati topljivost ciljanih spojeva i prijenos mase, jeftine su, ali često zahtjevaju više dugotrajnih postupaka (Giacometti i sur., 2018). Mnogo bioaktivnih sastojaka toplinski je nestabilno i mogu biti degradirani ili potpuno izgubljeni tijekom konvencionalnih ekstrakcija, a dobiveni ekstrakti često sadrže i nepoželjne komponente koje će utjecati na kvalitetu, čistoću i izgled ekstrakta (Garavand, 2019). Konvencionalna ekstrakcija je još uvijek dugotrajan proces s niskom selektivnošću i velikom potrošnjom otapala te stoga nije u skladu s načelima „zelene“ kemije (Chemat i sur., 2017; Mnayer i sur., 2017).

Negativni učinci prethodno spomenutih termalnih metoda ekstrakcije mogu biti minimizirani aplikacijom netermalnih/inovativnih metoda koje uključuju primjenu mikrovalne energije, ultrazvučne energije, superkritičnih fluida, tekućine pod visokim tlakom, enzimima potpomognute ekstrakcije i druge (Belwal i sur., 2020). Ove metode karakterizira kraće potrebno vrijeme ekstrakcije, veći ekstrakcijski prinos, ušteda energije te smanjeni volumen upotrebljenih organskih otapala (Belwal i sur., 2018), a dobiveni ekstrakti su visokokvalitetnog sastava. Ograničenja inovativnih metoda ekstrakcije uglavnom se odnose na vrlo visoke troškove ulaganja, potrebe potpune kontrole parametara tijekom procesa te neprihvaćanje potrošača što usporava njihovu primjenu u industriji (Giacometti i sur., 2018).

### **2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Među metodama koje su svoju primjenu našle, kao svojesvrzne poboljšane zamjene konvencionalnim metodama, je i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Primjena mikrovalova i u drugim u prehrambenoj industriji nailazi na brojne primjene, poput sušenja, pasterizacije, sterilizacije, odmrzavanja i pečenja što ukazuje na njezin veliki potencijal. Mikrovalovi su elektromagnetski valovi čija frekvencija varira od 300 MHz do 300 GHz, međutim, za potrebe laboratorija koriste se valovi frekvencije 915 MHz i 2,45 GHz (Jambrak, 2012). Sastoje se od dva oscilirajuća polja, magnetskog i električnog, koja su međusobno okomita. Princip zagrijavanja mikrovalovima temelji se na njihovom direktnom utjecaju na

polarne materijale (Azmir i sur., 2013) i to tako da se energija mikrovalova pretvara u toplinu ionskom kondukcijom i dipolnom rotacijom. Ionska kondukcija odnosi se na elektroforetsku migraciju iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Otpor koji nastaje kao posljedica migracije iona stvara trenje što dovodi do zagrijavanja otopine. Dipolna rotacija podrazumijeva usklađivanje dipola molekula s brzo promjenjivim električnim poljem (Mandal i sur., 2007). Molekule otapala imaju tendenciju zadržavanja iste faze kao električno polje, ali zbog prevelike brzine mijenjanja električne komponente vala one to ne uspijevaju. Ta česta promjena smjera rezultira sudarom između molekula te posljedično dolazi do stvaranja topline (Azmir i sur., 2013). Ovi mehanizmi jasno pokazuju da će se samo dielektrični materijali i otapala s trajnim dipolom zagrijati. Kada mikrovalna toplina dođe u kontakt sa sitnim tragovima vlage unutar matrice stanice, dolazi do isparavanja i stvara se intezivan pritisak na staničnu stijenu koja puca te uzrokuje izlaženje aktivnih sastojaka (Ekezie i sur., 2019). Izbor otapala je u mikrovalnoj ekstrakciji jako važan, ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom da upijaju mikrovalove (Blekić i sur., 2011). Temperatura je još jedan vrlo važan parametar, u pravilu, što je viša to je i ekstrakcija bolja, međutim, kod ekstrakcije termolabilnih spojeva previsoka temperatura može dovesti do degradacije. Ostali parametri koji utječu na performance ekstrakcije potpomognute mikrovalovima uključuju omjer krute i tekuće tvari, vrijeme ekstrakcije, snagu mikrovalova, prirodu uzorka i miješanje (Ekezie i sur., 2019). Homogeno i unutarnje grijanje cijelog volumena je uvijek spomenuta kao glavna karakteristika i prednost ekstrakcije mikrovalovima (Vinatoru i sur., 2017) jer suprotno ostalim ekstrakcijskim metodama, u ovom procesu prijenos mase i topline događa se istovremeno prema unutra i prema van biljke te je porast temperature i prijenosa mase veći pa je i samo vrijeme ekstrakcije puno kraće (Garavand, 2019).

Dva su tipa uređaja za ekstrakciju mikrovalovima ovisno o tome odvija li se proces pri atmosferskom tlaku (sustav vođen u otvorenoj posudi) ili pri povišenom tlaku (sustav vođen u zatvorenoj posudi). Mandal i suradnici (2007) opisali su prednosti otvorenog sustava kao: mogućnost dostizanja viših temperature jer povišenjem tlaka dolazi do povišenja točke ključanja otapala, izbjegnuta je mogućnost gubitka hlapljivih tvari, potrebno je manje otapala, ali potrebno je pripaziti na potencijalno iparavanje opasnih plinova nakon otvaranja posude. Nedostatak je što je ograničena količina uzorka koja može biti procesirana, potrebno je ohladiti posudu nakon završetka procesa te postoji opasnost od eksplozije zbog visokog tlaka.

Otvoreni sustavi mogu biti još učinkovitiji od zatvorenih, a i primjena atmosferskog tlaka umanjuje rizike od eksplozije i omogućuje primjenu staklenih i kvarcnih posuda. Tijekom trajanja procesa moguće je dodavati otapalo i procesirati veće količine uzorka te je prikladniji sustav za tretiranje termolabilnih materijala, međutim, često je potrebno duže vrijeme ekstrakcije i manji broj uzoraka se može procesirati istovremeno nego kod zatvorenih uređaja (Mandal i sur., 2007).

### **2.2.2. Ekstrakcija subkritičnom vodom**

Pretpostavlja se kako će u bližoj budućnosti sve više rasti interes za održivim tehnologijama ekstrakcije, a jedna takva, koja svakako nadilazi nedostatak tradicionalnih metoda, je i ekstrakcija subkritičnom vodom. Ova metoda ekstrakcije odlična je zamjena za konvencionalne metode ekstrakcije, kao sigurna, netoksična, nezapaljiva, jeftina, učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda koja se koristi za ekstrakciju različitih bioaktivnih sastojaka iz biljnih materijala (Jokić i sur., 2019). Pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi (25 °C) voda je polarno otapalo vrlo visoke dielektrične konstante (80) koja ima svojstvo zadržavanja u tekućem stanju u temperaturnom rasponu od 100°C (točka vrelišta vode) do 374 °C (kritična točka vode). Porastom temperature i tlaka do kritičnih vrijednosti dolazi do strukturnih promjena unutar molekule vode, smanjuje se viskozitet, površinska napetost i polarnost, što u konačnici utječe na modifikaciju vrijednosti dielektrične konstante prema manje polarnoj, čime se omogućava otapanje manje polarnih i nepolarnih komponenti. Povišenim tlakom olakšana je penetracija vode u pore matriksa, ali pri povišenoj temperaturi moguća je degradacija termolabilnih komponenti (Nastić i sur., 2018) reakcijama oksidacije i hidrolize (Zhang i sur., 2019). Dosadašnja istraživanja u pogledu ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih komponenti (Zhang i sur., 2019), antioksidanasa (Nastić i sur., 2018) i mnogih drugih, potvrdila su ekonomičnost primjene subkritične vode u pripremi ekstrakata, kao i potencijal u osiguranju visokokvalitetnih ekstrakata značajne antoksidacijske aktivnosti i postignute selektivnosti za određenu komponentu (Zhang i sur., 2019). Reducirana količina otapala, kraće ekstrakcijsko vrijeme, olakšana automatizacija, selektivnost, mogućnost kombinacije s drugim ekstrakcijskim metodama navode se kao glavne prednosti ekstrakcije subkritičnom vodom (Garavand i sur., 2019).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 Materijal

#### 3.1.1. Uzorak

U eksperimentu su korišteni nadzemni dijelovi biljke trave ive (*Teucrium montanum* L.), sakupljene u jadranskoj regiji Republike Hrvatske na zemljopisnom području Općine Klis (Splitsko- dalmatinska županija). Biljni materijal je sakupljen od strane dugogodišnjeg sakupljača ove biljne vrste, pažljivo sortiran, očišćen od stranih primjesa te osušen na prozračnom mjestu, zaklonjenom od sunca. U cilju osiguranja reprezentativnog uzorka, tako osušena trava iva usitnjena je prosijana kroz metalno sito veličine pora 450 µm. Izdvojena frakcija (<450 µm) se koristila u daljnjim pripremama ekstrakata mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom te ekstrakcijom subkritičnom vodom pri zadanim uvjetima.

#### 3.1.2. Kemikalije

Određivanje udjela ukupnih polifenola:

- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS i DPPH metodom:

- Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Malinckrodt Baker B.V. (Amsterdam, Nizozemska)
- 7 mM otopina 2,2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfonska kiselina) dijamonijske soli (ABTS), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), Fluka (St. Gallen, Švicarska)
- 140 mM otopina kalijevog persulfata, Sigma-Aldrich (Steinhaim, Njemačka)

HPLC analiza:

- Mravlja kiselina 99 %-tna, Carlo Erba (Barcelona, Španjolska)

- Acetonitril, Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Verbaskozid, HPLC standard (90,3 % čistoće)
- Ehinakozid, HPLC standard (98 % čistoće)

### 3.1.3. Aparatura i pribor

Priprema uzorka i ekstrakata:

- Električni mlin za kavu
- Metalno sito veličine pora 450 µm
- Mikrovalni uređaj (Ethos Easy, Milestone Srl, Sorisole, Italija)
- Sistem za subkritičnu vodu (Prehrambeno- tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku)
- Laboratorijsko posuđe (plastične kivete, pipete, laboratorijske čaše, odmjerne tikvice volumena 10 mL, 100 mL i 200 mL, staklene epruvete, mikropipeta, staklene vialice, Eppendorf epruvete, menzure)
- Termometar, štoperica
- Filter papir (Whatman Grade 5)

Određivanje udjela suhe tvari:

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, A&D Instruments (Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Laboratorijski sušionik, Tehnica (Železnik, Slovenija)
- Aluminijske posudice s poklopcima, eksikator

Spektroskopske metode:

- Spektrofotometar Helios γ, ThermoSpectronic (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Kiveta (10 mm) za spektrofotometrijsko mjerenje
- Magnetna miješalica (Witeg, Njemačka)
- Automatske mikropipete (Gilson, SAD)
- Uređaj za homogenizaciju reakcijske smjese – Vortex, Dlab Scientific, (Schiltigheim, Francuska)
- Spektrometar Nicolet iS10 Thermoscientific (Stockholm, Švedska)

HPLC analiza:

- HPLC-PDA sustav Agilent 1200 Series (tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti s PDA („Photo Diode Array“) detekcijom), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC kolona Zorbax Extended C-18 (250 mm x 4,6 mm x 2,5 µm, 100 Å), Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- HPLC vijale s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (Kalifornija, SAD)
- Celulozno-acetatni mikrofilteri veličine pora 0,45 µm, Machery-Nagel (Düren, Njemačka)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Određivanje suhe tvari**

#### Princip metode

Udjel suhe tvari u travi ivi određen je prema AOAC 930.15 (1990a) metodi. Metoda se temelji na sušenju biljnog materijala do konstantne mase odnosno do izdvajanja slobodne vode iz uzorka. Poznavajući početnu masu uzorka moguće je izračunati udjel suhe tvari u uzorku.

#### Postupak rada

Na početku rada potrebno je čistu aluminijsku posudicu s poklopcem osušiti, do konstantne mase u sušioniku temperature 105 °C. Zatim se u toj posudici odvaži 1 g (s točnošću ± 0,0001) homogeniziranog uzorka te se unosi u sušionik nepokrivena. Od trenutka kada se u sušnici postigne temperatura točno 105 °C započinje period sušenja posudice s uzorkom i poklopca koji traje dva sata. Pri isteku tog perioda posudica s uzorkom se poklopi dok je još u sušioniku i prebacuje u eksikator kako bi se ohladila na sobnu temperaturu. Nakon hlađenja se važe te je potrebno ponoviti postupak dok se ne postigne konstantna masa uzorka u posudici (s točnošću ± 0,0003 g). Uzorak zaostao u posudici nakon sušenja predstavlja suhu tvar početnog uzorka, a razlika masa uzoraka prije i nakon sušenja predstavlja udjel vode u uzorku.

## Izračun

Udjel vode u uzorku se računa prema formuli [1], a udio suhe tvari prema formuli [2]. Konačni rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost svi mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

$$\text{udjel vode (\%)} = [(m_1 - m_3)/(m_2 - m_1)] * 100 \quad [1]$$

$$\text{udjel suhe tvari (\%)} = 100 \% - \text{udjel vode (\%)} \quad [2]$$

Pri čemu je  $m_1$  – masa prazne aluminijske posudice (g),  $m_2$  – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g) i  $m_3$  – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

### **3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka trave ive potpomognuta mikrovalovima provedena je prema definiranim parametrima (Tablica 1): temperature (50, 70 i 90 °C), vremena ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta) i omjera uzorka i otapala (1g: 25 mL/40 mL/100 mL što je u tablici prikazano kao 0,01, 0,025, 0,04). Ekstrakcija se provodila u specijalnim tubama pozicioniranim na rotacijskom difuzoru za podjednaku distribuciju mikrovalne energije (900 W), pri precizno kontroliranoj temperaturi *in situ* pomoću beskontaktnog senzora. Pri završetku procesa, supernatant je profiltriran kroz filter papir (Whatman No.5), a talog je dodatno ispran 2 puta (ukupno 2 mL) u cilju maksimalnog izdvajanja ekstrahiranih bioaktivnih spojeva iz taloga. Uzorci su skladišteni pri -18 °C do analiza, a ekstrakcije su provedene u duplikatu (n=2).

**Tablica 1.** Parametri ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Broj uzorka	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer otapala i uzorka (g/mL)
1	50	3	0,04
2	50	3	0,01
3	50	6	0,025
4	50	9	0,04
5	50	9	0,01
6	70	3	0,025
7	70	6	0,025
8	70	6	0,04
9	70	6	0,01
10	70	9	0,025
11	90	3	0,04



<b>12</b>	90	3	0,01
<b>13</b>	90	6	0,025
<b>14</b>	90	9	0,04
<b>15</b>	90	9	0,01

### 3.2.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija uzoraka provodila se u uređaju diskontinuiranog načina rada mijenjanjem tri parametra metode (Tablica 2): temperature; 120, 160 ili 200°C, vremena; 5, 10 ili 15 minuta i omjera kruto/tekuće 1g: 25 mL/40 mL/100 mL pri čemu su ti omjeri u tablici 2 prikazani kao 0,4, 0,025 i 0,01. Tlak je konstantan tijekom cijelog procesa. Smjesa se u reaktoru zagrije električnom žicom, N<sub>2</sub> se koristi za kontrolu tlaka i uklanjanje kisika kako ne bi došlo do reakcije oksidacije. Nakon završetka ekstrakcije reaktor se brzo ohladi te se smjesa filtrira vakuum filtracijom. Tekući ostatak je ispran vodom kako bi se kvantitativno pokupili ostaci ekstrahiranih komponenata.

**Tablica 2.** Parametri ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju

<b>Broj uzorka</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>Omjer otapala i uzorka (g/mL)</b>
<b>1</b>	120	15	0,01
<b>2</b>	120	5	0,01
<b>3</b>	120	5	0,04
<b>4</b>	120	10	0,025
<b>5</b>	120	15	0,04
<b>6</b>	160	10	0,01
<b>7</b>	160	10	0,025
<b>8</b>	160	15	0,025
<b>9</b>	160	10	0,04
<b>10</b>	160	5	0,025
<b>11</b>	200	10	0,025
<b>12</b>	200	15	0,04
<b>13</b>	200	5	0,04
<b>14</b>	200	5	0,01
<b>15</b>	200	15	0,01

### 3.2.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode

Kvantifikacija ukupnih fenola u u mnogobrojnim prirodnim uzorcima bazirana je na kolorimetrijskoj reakciji fenolnih komponenata s Folin-Ciocalteau reagensom. Metoda se temelji na transferu elektrona u alkalnom mediju s fenolnih komponenti na molbidenske/volframove komplekse kiselina te tvori plavo obojene komplekse koji se detektiraju spektrofotometrijski na 765 nm (Ainsworth i sur. 2007.).

#### Postupak rada

U epruvetu otpipetiramo 7,9 mL destilirane vode, 100 µL ekstrakta (razrijeđenog), 500 µL Folin-Ciocalteau reagensa (prethodno pripremljen razrjeđivanjem s vodom u omjeru 1:2) i 1,5 mL 20% otopine natrijevog karbonata. Priprema slijepe probe je identična osim što umjesto 100 µL ekstrakta otpipetiramo 100 µL destilirane vode. Epruvete se vorteksiraju i ostave 2 sata na sobnoj temperature, u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja na 765 nm. Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Singleton i Rossi, 1965). Apsorbanciju slijepe probe oduzimamo od apsorbancije ekstrakta.

#### Izračun

Konstruirana baždarena krivulja za standard galne kiseline prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg/L) te se iz nje određuje udio ukupnih polifenola u ekstraktu. Konačni rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost svih mjerenja sa standardnim devijacijama u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g čestica pri čemu je potrebno rezultat pomnožiti s faktorom razrijeđenja originalnog ekstrakta.

Jednadžba baždarene krivulje za standard galne kiseline:

$$y = 0,001x - 0,0001 \quad [3]$$

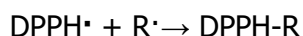
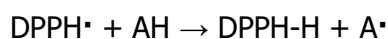
pri čemu je x – udio ukupnih polifenola (mg/L), a y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm.

### **3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta**

#### **3.2.5.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom**

##### Princip metode

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti pojedinih komponenata one se podvrgavaju reakciji s DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), stabilnim slobodnim radikalom, u metanolnoj otopini. DPPH zbog delokalizacije nesparenog elektrona pokazuje ljubičasto obojenje i ima maksimum apsorpcije na 515 nm. Miješanjem s otopinom koja se ponaša kao donor elektrona (antioksidansom) dolazi do promjene boje otopine u žutu čime opada i apsorbanacija. (Brand-Williams i sur., 1995.; Szabo i sur., 2007).



### Postupak rada

Otopina DPPH radikala 0,094 mM i volumena 100 mL se pripremi tako da se na analitičkoj vagi odvaži 0,0037 g DPPH i otopi u metanolu (miješanjem na magnetnoj miješalici). Zbog izrazite nestabilnosti radikala otopina se čuva u tikvici omotanoj aluminijskom folijom u frižideru. Apsorbancija ove otopine iznosi oko 1. U epruvete se otpipetira 100 µL ekstrakta (prethodno razrijeđenog) i 3.9 mL pripremljene otopine DPPH. Vorteksira se i ostavi u mraku 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbanacija na 515 nm. U slijepu probu umjesto ekstrakta se otpipetira 100 µL metanola te 3.9 mL otopine DPPH.

### Izračun

Izmjerena apsorbanacija ekstrakta oduzme se od izmjerene apsorbanacije slijepa probe te dobivena vrijednost predstavlja  $\Delta A$  koja se prema jednadžbi baždarene krivulje za standard Trolox-a preračunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Baždarena krivulja za standard Trolox-a prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mmol/L) te se iz jednadžbe pravca određuje se antioksidacijski kapacitet ekstrakta. Konačni rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost svih mjerenja sa standardnim devijacijama u mmol Trolox-a/g uzorka. Ukoliko je korišten razrijeđeni ekstrakt, potrebno je pomnožiti rezultat s faktorom razrjeđenja originalnog ekstrakta.

Jednažba baždarene krivulje za standard Trolox-a:

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [4]$$

pri čemu je x - koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol/L), a y - izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 515 nm.

### 3.2.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

#### Princip metode

Antioksidacijska aktivnost mjerena ABTS metodom temelji se na "gašenju" plavo-zelenog 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kation), koji je pripremljen oksidacijom otopine ABTS-a s kalijevim persulfatom, nekoliko sati prije same analize. Maksimum apsorbancije postiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodani antioksidans reagira s ABTS radikalom pri čemu dolazi do redukcije ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu i mjeri se smanjenjem 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 (Re i sur., 1999.).

#### Postupak rada

Otopina ABTS<sup>+</sup> radikala se pripremi tako da se pomiješa 88 µL (140 mM) otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) i nadopuni otopinom ABTS (7mM) reagensa do volumena 5 mL. Neće doći do potpune oksidacije ABTS-a zato jer ABTS i kalijev persulfat reagiraju u omjeru 1:0,5 te je potrebno pripremljenu otopinu ostaviti stajati preko noći (12-16 sati), na sobnoj temperature u tikvici omotanoj folijom. Prije same analize otopina se razrijedi tako da se 1 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake (konačna koncentracija ABTS<sup>+</sup> radikala iznosi 1%). Apsorbancija te otopine treba iznositi  $0,70 \pm 0,02$ . U epruvetu otpipetiramo 20 µL (razrijeđenog) ekstrakta i 2 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala. Slijepa proba sadrži 20 µL destilirane vode i 2 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala. Nakon 6 minuta trajanja reakcije (u mraku), mjeri se apsorbancija na 734 nm.

#### Izračun

Od apsorbancije slijepa probe se oduzima apsorbancija ekstrakta te dobivena vrijednost predstavlja  $\Delta A$  koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta se određuje iz konstruirane jednadžbe baždarene krivulje za standard Trolox-a, ona pokazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standard (mmol/L). Konačni rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost svih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u

mmol Trolox-a/g ekstrakta pri čemu je potrebno pomnožiti rezultat s faktorom razrjeđenja originalnog ekstrakta.

Jednadžba baždarene krivulje za standard Trolox-a:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [5]$$

pri čemu je x - antioksidacijski kapacitet ekstrakta (mmol/Trolox-a/L), a y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

### 3.2.6. Određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ekstraktima primjenom HPLC metode

Dominantni polifenolni spojevi dobivenih ekstrakata trave ive- ehinakozid i verbaskozid, identificirani su i kvantificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uparenom sa DAD detektorom (Agilent 1100/1200 Series, Agilent, Santa Clara, USA). Za separaciju i eluciju spojeva primijenjena je kromatografija obrnutih faza na analitičkoj koloni Zorbax extend C-18 (250×4,5 mm, 5 mikrona) (Agilent Technologies, USA), korištenjem dvije mobilne faze (Tablica 3): vodene faze A (1% mravlje kiseline u vodi, v/v) i organske faze B (1% mravlje kiseline u acetonitrilu, v/v). Protok mobilnih faza iznosio je 1 mL/min pri konstantnoj temperaturi od 25°C. Duljina trajanja metode iznosila je 52 min uz dodatnih 10 min ekvilibracije na početne uvjete metode, a volumen injektiranja uzorka postavljen je na 5 µL. Identifikacija odabranih polifenolnih spojeva provedena je usporedbom retencijskog vremena i karakterističnog UV spektra sa autentičnim standardima HPLC čistoće pri maksimumu aporpcije od 320 nm, dok je kvantifikacija provedena upotrebom jednadžbe standardne krivulje dobivene iz prethodno izrađenih baždarnih krivulja (Tablica 4) za ehinakozid i verbaskozid (20-100 µg/mL) (Šeremet i sur., 2021).

**Tablica 3.** Promjena gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	93	7
5	93	7
45	60	40
47	30	70
52	30	70

**Tablica 4.** Jednadžbe baždarenih pravaca identificiranih spojeva u uzorcima

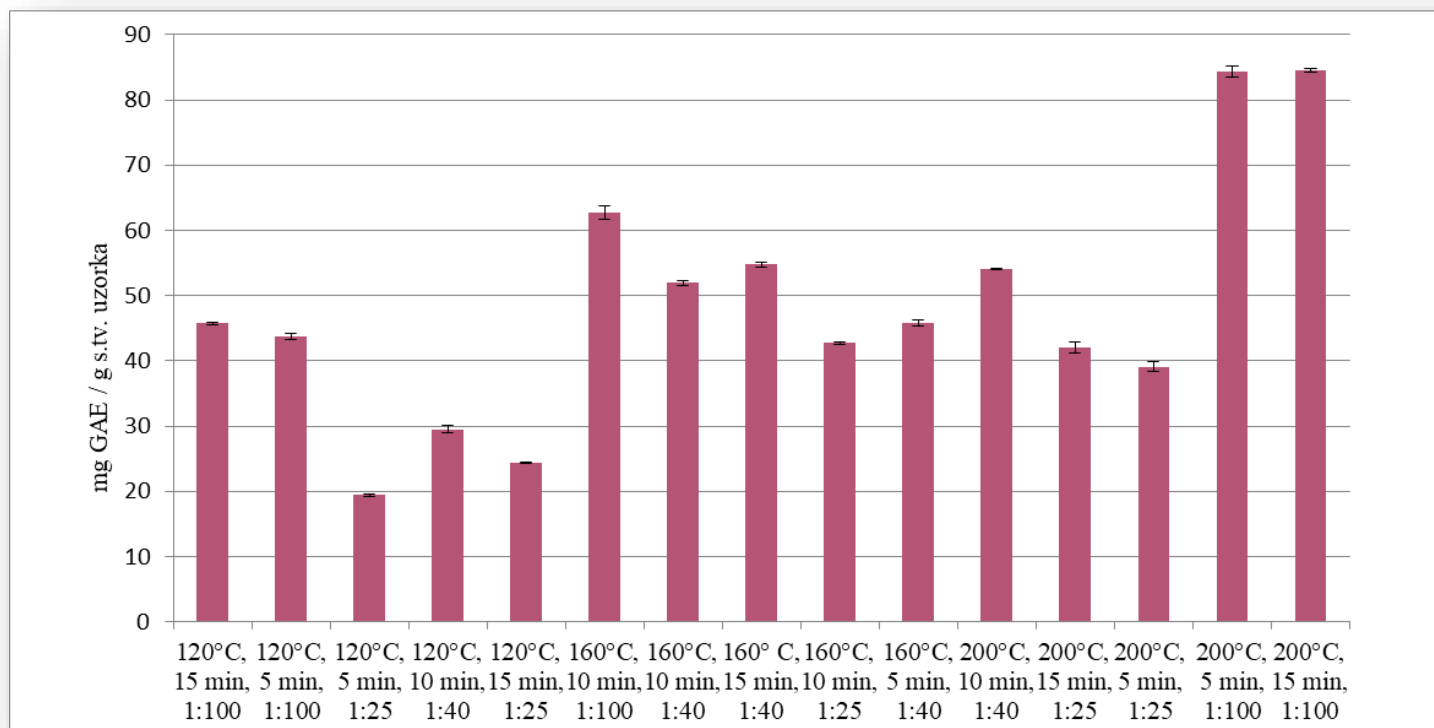
Naziv spoja	Jednadžba baždarenog pravca
<b>Verbaskozid</b>	$y = 5,7246x + 0,3262$
<b>Ehinakozid</b>	$y = 6,0122x + 2,6584$

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

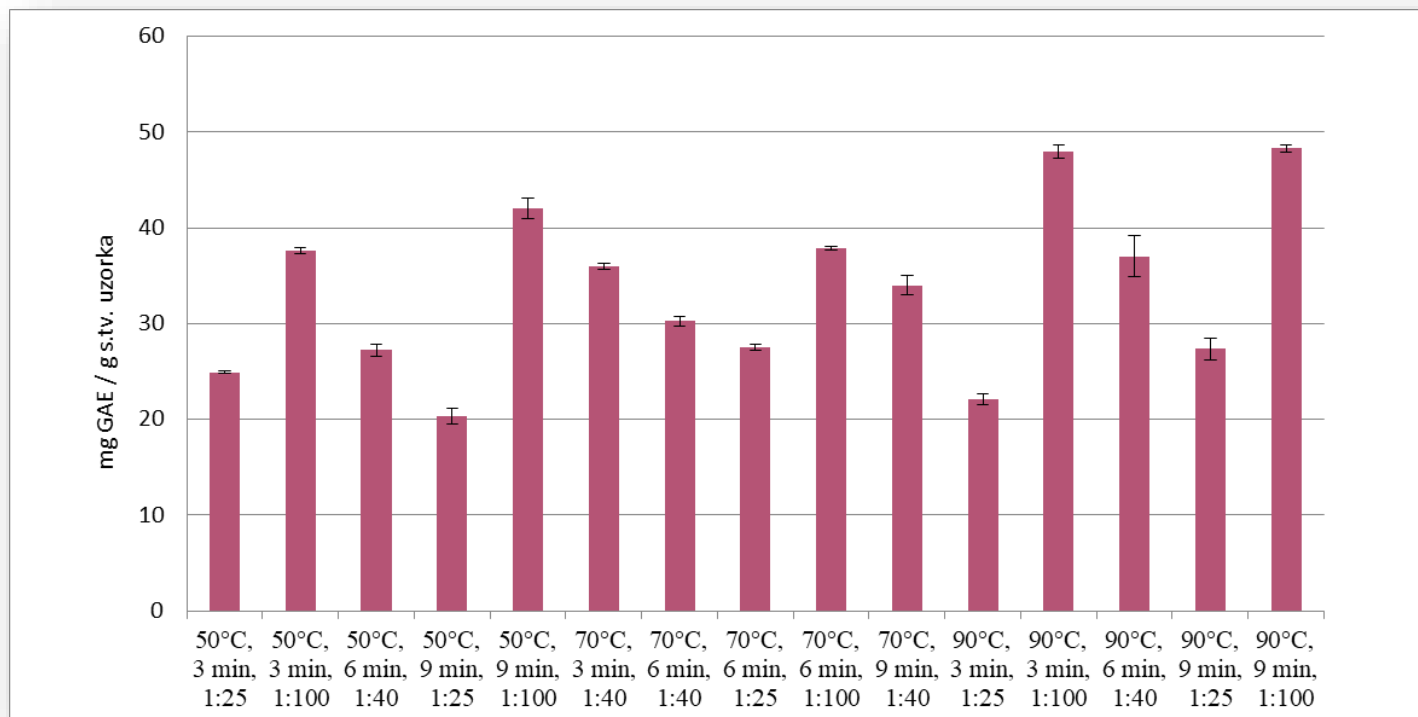
Budući da bioaktivni sastojci hrane koji imaju vrlo važnu ulogu u organizmu čovjeka, razvoj suvremene prehrambene industrije i napredak znanosti doveli su do kreiranja funkcionalne hrane, u čijoj proizvodnji se sve više koriste upravo ti bioaktivni sastojci prirodnoga podrijetla. Među brojnim biljnim vrstama, duge tradicije primjene u narodnoj medicini, ali još uvijek nedovoljno kemijski i farmakološki istraženima, je i trava iva (*Teucrium montanum L.*) čiji bioaktivni potencijal je istraživani u ovom radu.

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka kritična je točka u njihovom daljnjem izdvajanju i implementaciji u različite proizvode te je vrlo važno definirati optimalne uvjete ekstrakcije. U ovom istraživanju uzorci trave ive podvrgnuti su inovativnim metodama ekstrakcije-ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima i ekstrakciji subkričnom vodom, uz varijaciju pojedinih ekstrakcijskih parametara (temperatura, duljina trajanja ekstrakcije i omjer uzorak/otapalo). U dobivenim vodenim ekstraktima trave ive određen je udjel ukupnih polifenola, antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodama te su HPLC metodom identificirana i kvantificirana dva najzastupljenija polifenolna spoja: ehinakozid i verbaskozid.

#### 4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola u ekstraktima



**Slika 4.** Udio ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima trave ive dobivenih ekstrakcijom subkritičnom vodom



**Slika 5.** Udio ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima trave ive dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima



Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva iz biljaka može dati informaciju o antioksidacijskoj aktivnosti, kvaliteti hrane i potencijalnim utjecajima na zdravlje (Tumbas i sur. 2004). Antioksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva imaju zbog sposobnosti ponašanja kao reducirajući agensi i donori elektrona odnosno posjeduju redoks svojstva čime „hvataju“ slobodne radikale (Stanković, 2020).

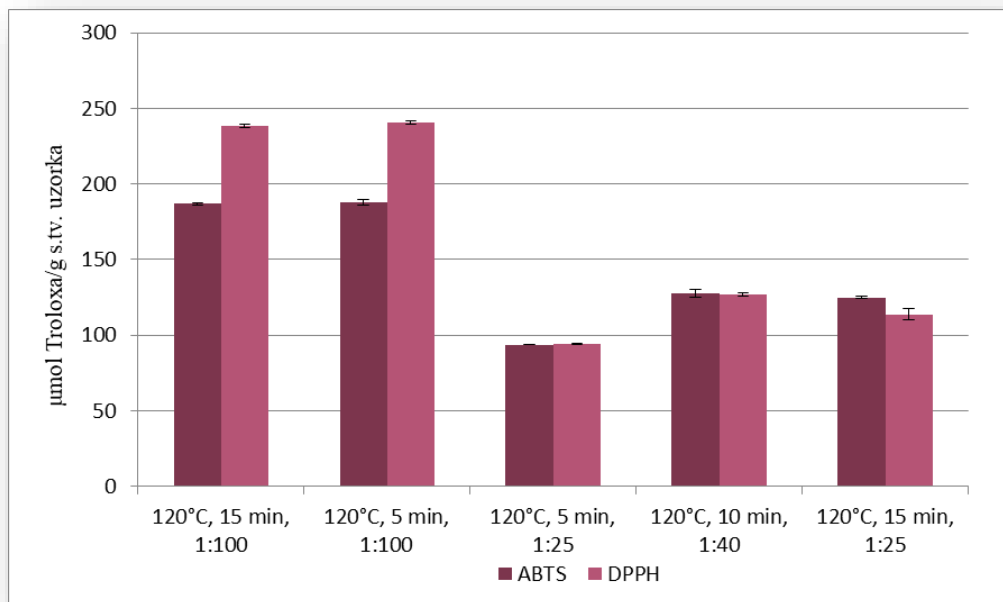
Udjeli ukupnih polifenola u uzorcima, dobivenima inovativnim metodama ekstrakcije, prikazani su na slikama 4 i 5 te su izraženi kao miligram ekvalenta galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka (mg GAE/g s.tv. uzorka).

Raspon udjela ukupnih polifenola, dobivenih ekstrakcijom subkritičnom vodom, kretao se od 19,39 do 84,49 mg GAE/g s.tv. uzorka, dok su se udjeli ukupnih polifenola u ekstraktima dobivenima primjenom mikrovalne ekstrakcije kretali od 24,34 do 48,28 mg GAE/ g s.tv. uzorka.

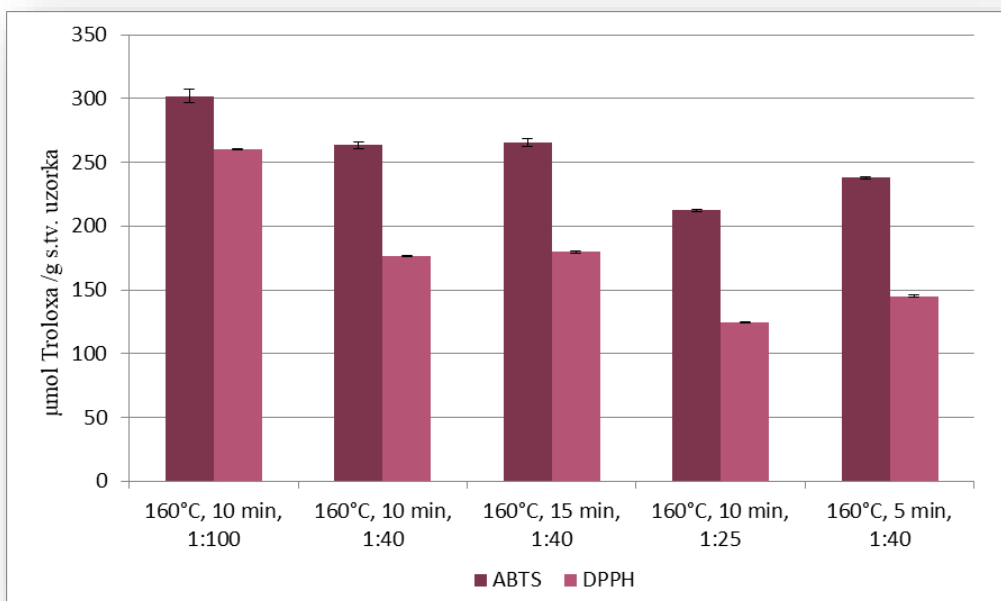
U radu Stankovića (2020) navedeno je da je pri optimalnim uvjetima (160 °C i 10 bara) ekstrakcije subkritičnom vodom udio ukupnih polifenola u ekstraktu iznosi 174,61 mg GAE/g s. tv. uzorka, što je puno viša vrijednost u odnosu na dobiveni rezultat, pri čemu svakako treba uzeti u obzir velik broj varijabli koje mogu utjecati na dobiveni rezultat. Prema Nastić i suradnicima (2018) zanemariv je utjecaj primjenjenog tlaka na ekstrakciju polifenolnih spojeva subkritičnom vodom, ali je zato temperatura vrlo značajan čimbenik. Također, velika razlika u rezultatima se može tumačiti i izborom otapala, koji prema Stanković i suradnicima (2020) ima ključnu ulogu u ekstrakciji polifenolnih komponenata iz biljnog matriksa. Visok udio ukupnih polifenola od 169,06 mg GAE/g s.tv. biljke dobiven je uporabom metanola kao otapala, dok je vrijednost od 154,81 mg GAE/g s.tv. dobivena uporabom vode kao otapala, pri čemu su ekstrahirani samo listovi, te se može zaključiti da i dijelovi biljke iz kojih se ekstrahiraju spojevi značajno utječu na njihov udio u ekstraktu (Stanković i sur., 2011).

Primjetan je porast udjela polifenolnih spojeva povišenjem temperature kod obje ekstrakcijske metode što je prema Nastiću (2018) povezano sa smanjenjem polarnosti vode i boljom solvatacijom srednje-polarnih polifenola povišenjem temperature. Autori su jasno pokazali utjecaj otapala na prinos ekstrakcije, međutim, i ostale parametre poput biljnog uzorka (sorta, zemljopisno područje, klima, stres, dio biljke...), prijenosa mase i tehnike ekstrakcije treba uzeti u obzir (Nastić i sur., 2018).

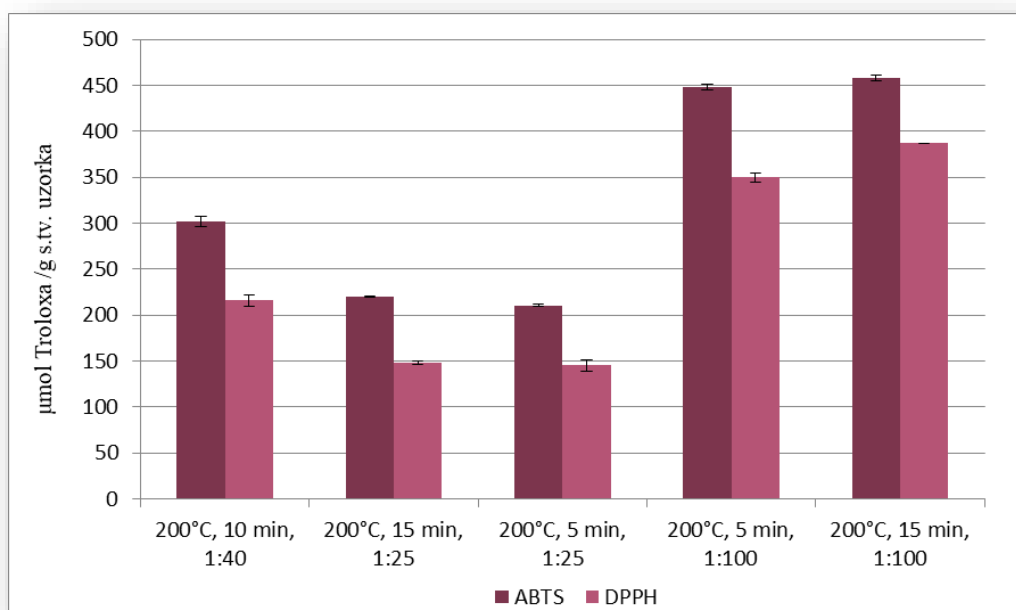
## 4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata



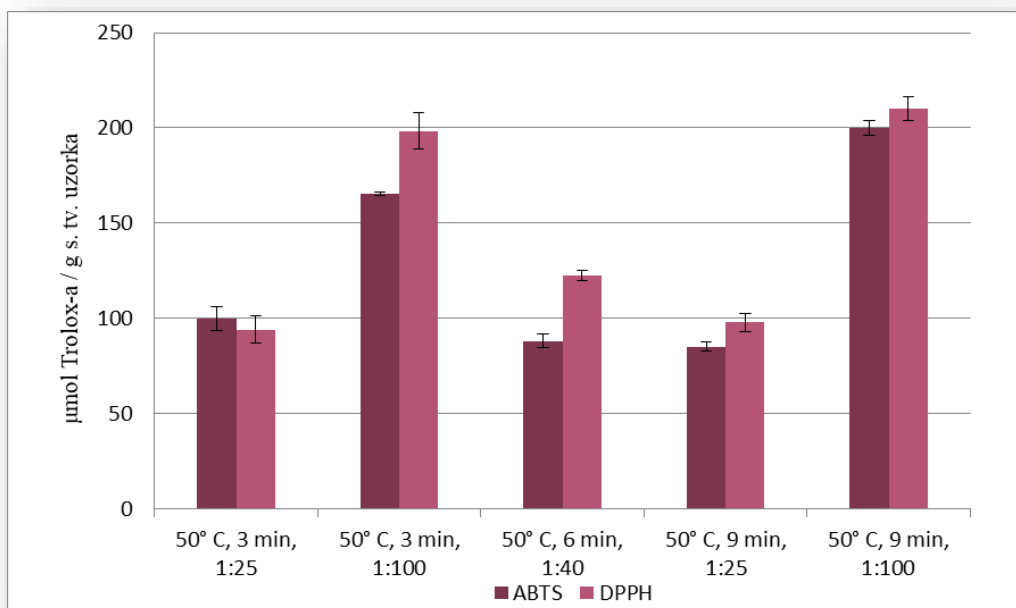
**Slika 6.** Antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata trave ive dobivenih ekstrakcijom subkričnom vodom pri 120 °C



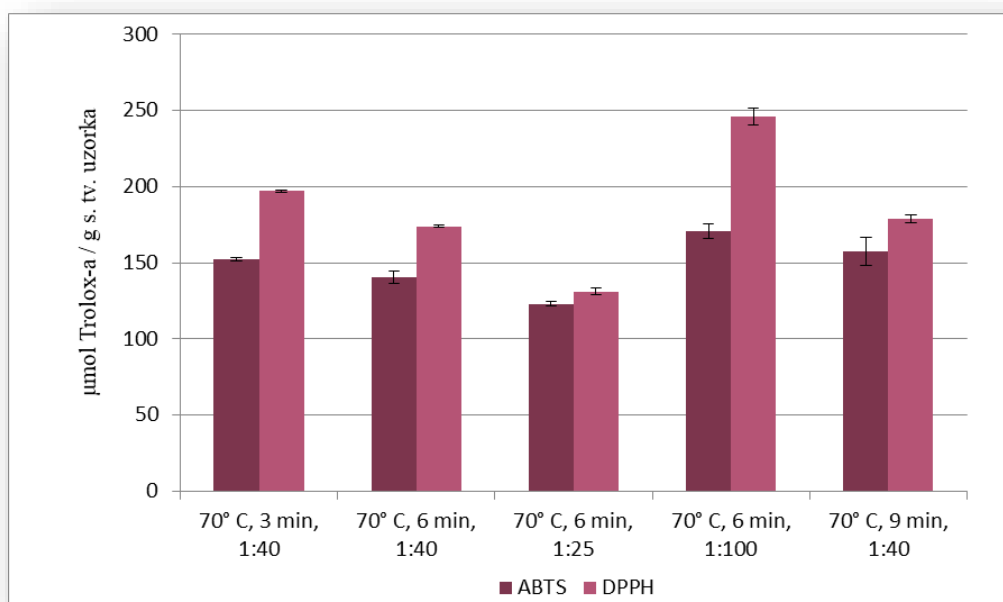
**Slika 7.** Antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata trave ive dobivenih ekstrakcijom subkritičnom vodom pri 160 °C



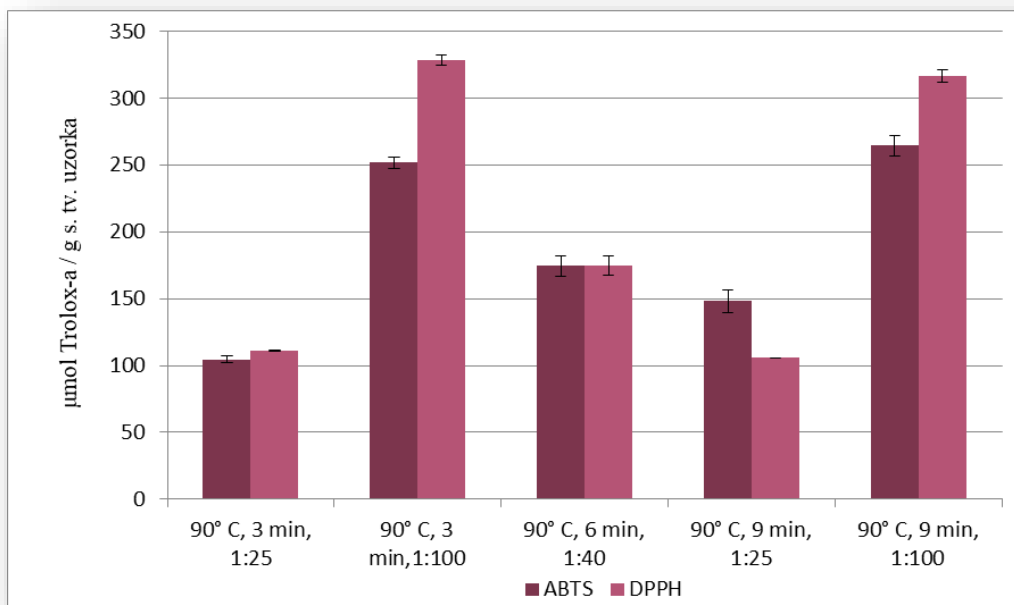
**Slika 8.** Antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata trave ive dobivenih ekstrakcijom subkritičnom vodom pri 200 °C



**Slika 9.** Antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata trave ive dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri 50 °C



**Slika 10.** Antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata trave ive dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri 70 °C



**Slika 11.** Antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata trave ive dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri 90 °C

Antioksidacijski kapacitet spojeva trave ive određen je ABTS i DPPH metodama te je prikazan na slikama 6-11. Rezultati vodenih ekstrakata dobivenih subkričnom vodom prikazani su na slikama 6-8 i kod ABTS metode isti se nalaze u rasponu od 93,64 do 457,92 µm Trolox-a/ g s.tv. uzorka, a kod DPPH metode te vrijednosti su od 94,18 do 387,03 µm Trolox-a/ g s.tv. uzorka. Na slikama 8-10 prikazani su rezultati za ekstrakte dobivene ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima, pri čemu se ABTS vrijednosti tih ekstrakata kreću u rasponu od 85,14 do 264,78 µm Trolox-a/ g s.tv. uzorka, dok su DPPH rezultati u rasponu od 93,99 do 328,54 µm Trolox-a/ g s.tv. uzorka.

Antioksidacijski kapacitet, a tako i udio polifenolnih spojeva, značajno su se povećali povišenjem temperature ekstrakcije što se može povezati sa smanjenjem polarosti korištenog otapala za ekstrakciju, kao i s boljom topljivošću polifenolnih spojeva (Čanadanović-Brunet i sur., 2006). Ovaj rezultat ukazuje na korelaciju antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta *T. montanum* i udjela polifenolnih komponenti (Nastić i sur, 2018), koja može biti i vrlo visoka, kao primjerice u radu Zlatić i suradnika (2017) kod kojih je  $r = 0.900$ .

Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom vodom u subkričnom stanju pokazuju nešto više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom, dok ekstrakti dobiveni primjenom

mikrovalne ekstrakcije imaju više vrijednosti određene DPPH metodom te ta razlika u rezultatima antioksidacijskog kapaciteta leži u činjenici da su primijenjene dvije različite metode kod kojih se za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste različiti slobodni radikali što znači da dolazi do drugačijih reakcija između slobodnih radikala i antioksidanasa u uzorcima, što ponajviše ovisi o strukturi polifenolnih spojeva, a kako su korištene različite metode ekstrakcije ekstrahirani su i različiti polifenolni spojevi u svakoj od njih (Kopjar i sur., 2013).

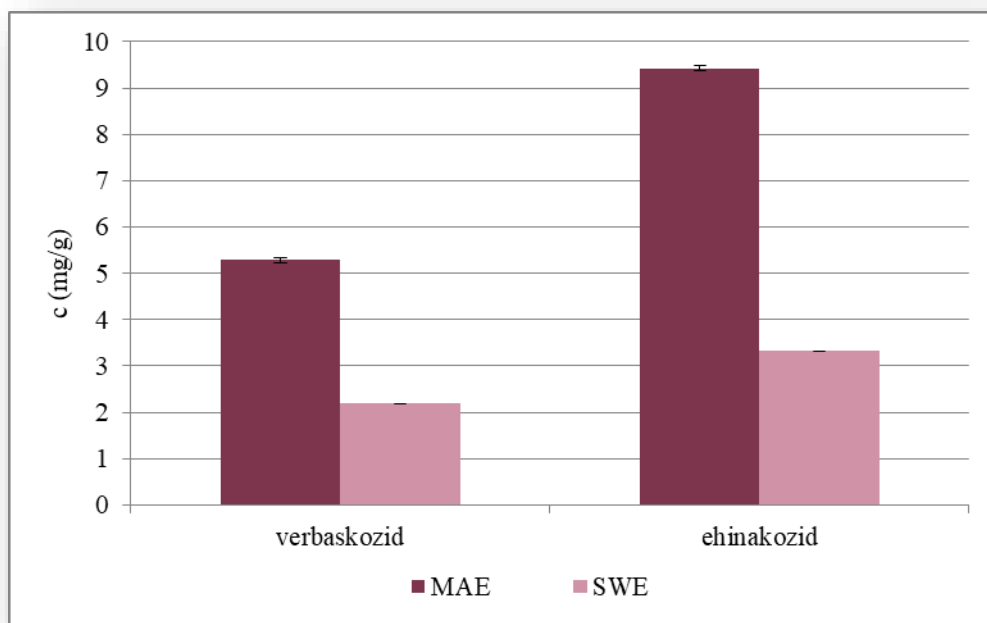
Analizirajući antioksidacijske kapacitete obje metode uočavamo porast kapaciteta s temperaturom, produljenjem vremena ekstrakcije, ali i povećanjem omjera uzorka i otapala. Naime, najviši antioksidacijski kapacitet pokazuju ekstrakti omjera uzorka i otapala 1:100 kod obje metode, pri čemu se može uočiti da kod ekstrakata koji imaju ovaj omjer i istu temperaturu ekstrakcije, duljina trajanja ekstrakcijske metode ne utječe značajno na analizirane parameter. Kod korigiranja temperature potrebno je obratiti pažnju na termolabilne polifenolne spojeve kako ne bi došlo do njihove degradacije (Belwal i sur. 2018). U radu Stanković i suradnika (2020) navedeno je i potvrđeno kako antioksidacijska aktivnost trave ive ovisi o dijelu, fenološkoj fazi biljke i vrsti tla, odnosno staništu te bi ovo mogli biti razlozi zašto se rezultati u istraživanjima razlikuju.

### **4.3. Određivanje udjela pojedinačnih polifenola u ekstraktima primjenom HPLC metode**

U ekstraktima trave ive određeni su udjeli najzastupljenijih polifenolih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, a rezultati su izraženi kao miligram polifenolog spoja po gramu suhe tvari uzorka (mg/g s.tv. uzorka). Mitreski i suradnici (2014) identificirali su ukupno 31 polifenolni spoj u *Teucrium* vrstama, među kojima se nalazi vrlo važna podskupina polifenolnih sekundarnih metabolita, feniletanoidi i njihovi glikozidi te ih je 12 identificiranih u *Teucrium* vrstama (Stanković, 2020). Poslijednjih nekoliko desetljeća provedena su brojna ispitivanja kojima je dokazano njihovo biološko djelovanje i farmakološka svojstva (Stanković, 2020).

Najčešći feniltanoidni glikozid prisutan u *Teucrium* vrstama je verbaskozid, a drugi najzastupljeniji spoj je ehinakozid. U vodenom ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (90 °C, 0,01 i 9 min) određen je najviši udio verbaskozida, 5,15 mg/g s.tv. uzorka, dok je udio ehinakozida bio 9,42 mg/g s.tv. uzorka (Slika 12). Niži udjeli verbaskozida određeni su analizama ekstrakata dobivenih primjenom subkritične vode,

pa su tako u uzorcima ekstrahiranim kod 200 °C, uz omjer uzorak:otapalo od 0,01, nakon ekstrakcije od 5 i 15 minuta, isti iznosili 0,94 mg/g s.tv. uzorka, odnosno 0,24 mg/g s.tv. uzorka, dok su udjeli ehinakozida također bili niži i iznosili su 0,89 i 1,61 mg/g s.tv. uzorka. Udio verbaskozida u *T. montanum*, u istraživanju Mitrevskog i suradnika (2014), iznosio je 2 mg/g s.tv uzorka, dok je udio ehinakozida bio 2,4 mg/g s.tv. uzorka.



**Slika 12.** Udio verbaskozida i ehinakozida u vodenim ekstraktima trave ive dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri 90 °C i subkritičnom vodom pri 200 °C

Na slici 12 prikazani su udjeli verbaskozida i ehinakozida u ekstraktima dobivenima ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima i subkritičnom vodom, pri čemu su uvjeti ekstrakcije mikrovalovima bili 90 °C, vrijeme trajanja ekstrakcije 9 minuta, a omjer otapala i uzorka 1:100. Ekstrakcija subkritičnom vodom provodila se pri 200 °C, uz omjer otapala i uzorka 1:100 tijekom 5 minuta.

Razlike u rezultatima udjela verbaskozida i ehinakozida u eksperimentu mogu se tumačiti različitim principima pojedine metodame i primjenjenim uvjetima ekstrakcije. Također, dobiveni udjeli navedenih spojeva primjenom mikrovalova pokazuju pozitivan učinak djelovanja temperature i tlaka uzrokujući bržu i selektivniju migraciju ovih ciljanih spojeva iz matriksa uzorka.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakcija subkritičnom vodom pokazala se puno učinkovitija u izdvajanju ukupnog udjela polifenolnih spojeva u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima te je SWE ekstrakt (200 °C, 0,01 i 15 min) karakteriziran najvišim udjelom ukupnih polifenola (84,49 mg GAE/s.tv. uzorka)
2. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata trave ive u skladu je s udjelom ukupnih polifenola.
3. Verbaskozid i ehinakozid su najzastupljeniji polifenolni spojevi trave ive koji su se u višim udjelima ekstrahirali primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima
4. Iako još uvijek nedovoljno istražena, trava iva pokazuje veliki potencijal kao izvor prirodnih bioaktivnih sastojaka s mogućnošću primjene u prehrambenoj i drugim granama industrije.



## 6. LITERATURA

Alipieva K., Korkina L., Erdogan Orhan I., Georgiev M.I. (2014) Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance, *Biotechnology Advances* **32**: 1065-1076.

Ainsworth E. A., Gillespie K. M. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nature Protocol* **2**: 875-877.

Anonymous 1, Flore Alpes <[FLOREALPES : Teucrium montanum / Germandrée des montagnes / Lamiaceae / Fiche détaillée Fleurs des Hautes-Alpes](#)> Pristupljeno 10.09.2021.

Anonymous 2, Research Gate <[https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-verbascoside-1-and-isoverbascoside-2\\_fig2\\_51091818](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-verbascoside-1-and-isoverbascoside-2_fig2_51091818)> Pristupljeno 10.09.2021.

Bagade S.B. i Patil M. (2019) Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **51**: 138-149.

Belwal T., Chemat F., Venskutonis P.R., Cravotto G., Jaiswal D.K., Bhatt I.D., Devkota H.P., Luo Z. (2020) Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **127**.

Belwal T., Ezzat S.M., Rastrelli L., Bhatt I.D., Daglia M., Baldi A., Devkota H.P., Orhan I.E., Patra J.K., Das G., Anandharamakrishnan C., Gomez-Gomez L., Nabavi S.F., Nabavi S.M., Atanasov A.G. (2018) A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **100**: 82-102.

Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011), Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian Journal of Food Science Technology* **3**, str. 32-47.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology* **28**: 25-30.

Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Jokić S., Mujić I., Bilić M., Velić D. (2011) Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **61**: 195 – 199.

Chizoba Ekezie F.-G., Sun D.-W., Cheng J.-H. (2017), Acceleration of microwaveassisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments, *Trends in Food Science & Technology* **67**: 160-172.

Chemat F., Rombaut N., Meullemiestre A., Turk M., Perino S., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. (2017), Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **41**: 357–377.

Čanadanović-Brunet J. M., Djilas S. M., Četković G.S., Tumbas V. T., Mandić A. I., Čanadanović V.M. (2006) Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. Extracts, *International Journal of Food Science and Technology* **41**: 667–673.

Garavand F., Rahae S., Vahedikia N., Jafari S.M. (2019) Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients, *Trends in Food Science & Technology* **89**: 26-44.

Giacometti J., Bursać Kovačević D., Putnik P., Gabrić D., Bilušić T., Krešić G., Stulić V., Barba F. J., Chemat F., Barbosa-Cánovas G., Režek Jambrak A.(2018), Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, **113**: 245-262.

Hasani-Ran S., Nayebi N., Larijani B., Abdollahi M.A. (2010) A Systematic Review of the Efficacy and Safety of *Teucrium* Species; from Anti-oxidant to Anti-diabetic Effects, *International Journal of Pharmacology* **6**(4):315-25.

Jokić S., Gagić T., Knez Ž., Banožić M., Škerget M. (2019) Separation of active compounds from tobacco waste using subcritical water extraction, *The Journal of Supercritical Fluids*, **153**.

Jovanović A., Petrović P., Đorđević V., Zdunić G., Šavikin K., Bugarski (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine*. **37**, str. 45-49.

Kopjar M., Knežević I., Piližota V. (2013) Sadržaj polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost voćnih sokova. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **2**: 42-49.

Malakov P.Y., Papanov G.Y., Mollov N.M. (1978a) Montanin A and B, A New furanoid diterpenes of nor-clerodane type from *Tetrahedron Lett.* **19**: 2025-6.

Malakov P.Y., Papanov G.Y., Mollov N.M., Spassov S.L. (1978b) Montanin-C, A New Furanoid Diterpene from *Teucrium montanum* L., *Zeitschrift für Naturforschung B*, **33**: 789-791.

Malakov P.Y., Papanov G.Y., Mollov N.M., Spassov S.L. (1978c) Montanin-D, A New furanoid diterpene of clerodane type from *Teucrium montanum* L., *Zeitschrift für Naturforsch B*. **33**: 1142-1144.

Papanov G.Y., Malakov P.Y. (1983) Clerodane diterpenoids from *Teucrium montanum* subsp. *Skorpilii*. *Phytochemistry*. **22** (12), str. 2787-2789.

Malakov P.Y., Papanov G.Y., Boneva I.M. (1992) Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium montanum*. *Phytochemistry*. **31**: 4029-4030.

Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. (2007) Review Article Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research **1**: 7-12.

Mitreski I., Petreska Stanoeva J., Stefova M., Stefkov G., Kulevanova S. (2014) Polyphenols in Representative *Teucrium* Species in the Flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MSn Profile and Content, *Natural Product Communications* **9**: 175-179.

Mnayer D., Fabiano-Tixier A.-S., Petitcolas E., Ruiz K., Hamieh T., Chemat F. (2017) Extraction of green absolute from thyme using ultrasound and sunflower oil, *Resource-Efficient Technologies* **3**: 12-21.

Nastić N., Švarc-Gajić J., Delerue-Matos C., Morais S., Barros, M. F., Moreira M. M. (2018) Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.) *The Journal of Supercritical Fluids* **138**: 200 – 206.

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 Biology and Medicine* **26**: 1231-1237.

Shahidi F. i Ambigaipalan P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review, *Journal of Functional Foods* **18**: 820-897.

Stanković M. (2020) *Teucrium* Species: Biology and Applications, Springer.

Stanković M. S., Niciforović N., Topuzović M., Solujić S. (2011) Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, *F. Supinum* (L.) Reichenb, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **25**: 2222-2227.

Stanković M., Stefanović O., Čomić L., Topuzović M., Radojević I., Solujić S. (2012) Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Open Life Sciences* **7**: 664-671.

Szabo M., Idițoiu C., Chambre D., Lupea A. (2007) Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay, *Chemical Papers*, **61**: 214-216.

Šeremet D., Jokić S., Aladić K., Vojvodić Cebin A., Božac N., Mandura A. i Komes D. (2021) Optimization of heat-, microwave-assisted and subcritical water extraction of phenolic compounds from ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) using response surface methodology. Prihvaćen za objavljivanje u *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*.

Zhang J., Wen C., Zhang H., Duan Y., Ma H. (2019) Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review, *Trends in Food Science & Technology* **95**: 183-195.

Zhang D., Lu C., Yu Z., Wang X., Yan L., Zhang J., Li H., Wang J., Wen A. (2017) Echinacoside Alleviates UVB Irradiation-Mediated Skin Damage via Inhibition of Oxidative Stress, DNA Damage, and Apoptosis, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**

## 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.



---

Diana Grizelj