

Praćenje antioksidacijske stabilnosti hidrolata ljekovitog i aromatičnog bilja

Majerić, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:155020>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Laura Majerić
58213483**

**Praćenje antioksidacijske stabilnosti hidrolata ljekovitog i
aromatičnog bilja**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Zagreb, 2022. godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Praćenje antioksidacijske stabilnosti hidrolata ljekovitog i aromatičnog bilja

Laura Majerić, 58213483

Sažetak:

Ljekovite biljke poput lovora (*Laurus nobilis* L.), ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) i majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) sadrže bioaktivne molekule zaslužne za antioksidacijska svojstva njihovih ekstrakata i eteričnih ulja. Hidrolati kao sekundarni produkti vodene destilacije eteričnih ulja zbog sadržaja dispergiranog eteričnog ulja i polarnih bioaktivnih molekula imaju potencijal primjene u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Stoga je cilj ovog istraživanja bio pratiti dinamiku promjene antioksidacijske aktivnosti hidrolata lovora, ljekovite kadulje i majčine dušice te njihove mješavine u omjeru 1:1:1 kroz 28 dana, primjenom DPPH i FRAP metoda. Hidrolat kao sekundarni proizvod dobiven je vodenom destilacijom primjenom aparature po Clevenger-u. Najveća antioksidacijska aktivnost određena je u hidrolatu lovora, zatim slijede biljna mješavina, majčina dušica te kadulja. Obje metode su pokazale da se antioksidacijska aktivnost svih hidrolata nakon 28 dana skladištenja na sobnoj temperaturi smanjila za gotovo 50 %.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, hidrolat, kadulja, lovor, majčina dušica

Rad sadrži: 33 stranica, 16 slika, 1 tablica, 49 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Pomoć pri izradi: mag. nutr., Erika Dobroslavić

Datum obrane: 08.07.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Antioxidant stability of hydrolates from medicinal and aromatic plants

Laura Majerić, 58213483

Abstract:

Medicinal plants such as bay laurel (*Laurus nobilis* L.), sage (*Salvia Officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) contain bioactive molecules responsible for the antioxidant properties of their extracts and essential oils. Hydrolates as secondary products of hydrodistillation of essential oils due to dispersed essential oil and polar bioactive molecules have potential for use in the food and cosmetics industries. Therefore, the aim of this study was to monitor antioxidant activity of bay laurel, sage, wild thyme hydrolate and the hydrolate of their mixture in a ratio of 1:1:1 over 28 days using the DPPH and FRAP methods. Hydrolate as a secondary product was obtained by hydrodistillation using the Clevenger apparatus. The highest antioxidant activity was determined in laurel hydrolate, followed by plant mixture, thyme and sage. Both methods showed that antioxidant activity of all hydrolates decreased by almost 50% after 28 days of storage at room temperature.

Keywords: antioxidant activity, bay laurel, hydrolate, sage, wild thyme

Thesis contains: 33 pages, 16 figures, 1 table, 49 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Ivona Elez Garofulić, Assistant Professor

Technical support and assistance: Erika Dobrosravić, mag. nutr.

Thesis defended: July 8, 2022

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta "Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi" (KK.01.1.1.04.0093) sufinanciran od strane Vlade Republike Hrvatske i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj – Operativni program konkurentnosti i kohezija. (KK.01.1.1.04.)

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI UVOD.....	2
2.1.	POSTUPCI DESTILACIJE ETERIČNIH ULJA	2
2.1.1.	DESTILACIJA VODENOM PAROM.....	2
2.1.2.	VODENA DESTILACIJA (HIDRODESTILACIJA) APARATUROM PO CLEVINGER-U	2
2.1.3.	TURBODESTILACIJA (TURBOLIZA).....	4
2.1.4.	DESTILACIJA POTPOMOĞNUTA MIKROVALOVIMA	5
2.2.	HIDROLATI	5
2.2.1.	KEMIJSKA SVOJSTVA HIDROLATA	6
2.3.	LOVOR	8
2.3.1.	HIDROLAT LOVORA.....	8
2.4.	MAJČINA DUŠICA.....	9
2.4.1.	HIDROLAT MAJČINE DUŠICE.....	10
2.5.	LJEKOVITA KADULJA	11
2.5.1.	HIDROLAT KADULJE	12
2.6.	METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	13
2.6.1.	HAT METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	13
2.6.2.	SET METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	13
2.6.2.1.	DPPH	14
2.6.2.2.	FRAP.....	15

2.6.3. TROLOX.....	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. MATERIJAL	17
3.2. KEMIKALIJE I UREĐAJI.....	17
3.3. METODE RADA	18
3.3.1. PROIZVODNJA HIDROLATA	18
3.3.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM	20
3.4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP METODOM.....	21
3.3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST IZVORNIH HIDROLATA ODREĐENA DPPH I FRAP METODOM	23
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA STABILNOST HIDROLATA TIJEKOM 28 DANA ODREĐENA DPPH I FRAP METODOM	24
4.3. KORELACIJA REZULTATA DOBIVENIH DPPH I FRAP METODOM.....	26
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Biljke porodica Lamiaceae (majčina dušica, kadulja) i Lauraceae (lovor) su biljke karakteristične za mediteransko područje, a tijekom godina su se pokazale korisne pri liječenju raznih oboljenja kao što su respiratorne bolesti, kožna oboljenja, gastrointestinalne bolesti i dr. Navedena djelovanja mogu se pripisati visokom udjelu različitih bioaktivnih molekula. Dok je antioksidativni potencijal biljnih ekstrakata i eteričnih ulja već dobro istražen, potencijal hidrolata kao sekundarnih produkata vodene destilacije u posljednje vrijeme je u fokusu istraživanja. Hidrolati se sastoje od vode koja se kondenzira tijekom destilacije s malom količinom dispergiranog eteričnog ulja koje utječe na antioksidativna i antimikrobna svojstva, zbog čega imaju potencijalnu primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Hidrolati se u kozmetičkoj industriji primjenjuju najčešće u proizvodnji parfema i pripravaka za njegu kože, a u prehrambenoj industriji pronalaze primjenu za aromatiziranje i konzerviranje minimalno procesiranog voća i povrća. U kozmetičkim proizvodima, hidrolati postaju sve popularniji i imaju široku primjenu u rješavanju različitih estetskih problema. Iako sadrže polarnije sastavnice eteričnih ulja, za razliku od njih, hidrolati se mogu primjeniti direktno, bez razrjeđivanja.

Cilj ovog istraživanja je ispitati antioksidacijsku stabilnost hidrolata dobivenih vodenom destilacijom po Clevenger-u iz uzoraka lovora, majčine dušice, kadulje i mješavine navedenih biljaka omjeru 1:1:1. Ispitivanje dinamike promjene antioksidacijske aktivnosti provedeno je nakon 14 i 28 dana počevši od nultog kontrolnog uzorka, a antioksidacijska aktivnost određivana je primjenom FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i DPPH metode.

2. TEORIJSKI UVOD

2.1. Postupci destilacije eteričnih ulja

2.1.1. Destilacija vodenom parom

Destilacija vodenom parom provodi se na temperaturi nižoj od točke vrelišta komponenti. Ova metoda je korisna za termolabilne komponente poput aromatičnih spojeva. Toplina pare uzrokuje lom u porama uzorka i time omogućava oslobađanje željenog spoja iz matriksa. Prema Raoultovom zakonu, točka vrelišta smjese će se smanjiti ako pomiješamo dvije tekućine koje se međusobno ne miješaju. Stoga, u mješavini hlapljivih spojeva čije su točke vrelišta između 150 i 300 °C i vode, čija je točka vrelišta na oko 100 °C, točka isparavanja smjese će biti bliža točki isparavanja vode (Fongang i sur., 2021). Stoga, ova metoda je nešto manje kvalitete u samom profilu aromatskih spojeva, te se koristi u industrijskim ili poluindustrijskim pogonima. Destilacija vodenom parom se provodi u uređaju koji sadrži kotao u kojem se provodi destilacija, kondenzator u kojem kondenziraju vodena para i pare eteričnog ulja te florentinske boce u kojoj se izdvajaju eterično ulje i hidrolat. Ukoliko se radi o većim postrojenjima u kojima se vrši destilacija vodenom parom, vodena para se generira u parnim kotlovima izvan destilatora te se dovodi u parni kotao. Destilacija se provodi na način da se željeni uzorak postavi na perforirano dno i tako para prolazi kroz biljni materijal i sa sobom odnosi hlapljive komponente eteričnog ulja. Dovođenjem hladne vode pomoću višecijevnog kondenzatora, vodena para s eteričnim uljem se hladi i kondenzira, te posebno sakuplja u florentinsku bocu. U florentinskoj boci, zbog različitosti u gustoći i topljivosti, dolazi do razdvajanja faza od kojih gornju fazu čini eterično ulje, a donju hidrolat.

2.1.2. Vodena destilacija (hidrodestilacija) aparaturom po Clevenger-u

Vodena destilacija, kao i destilacija vodenom parom, je metoda koja se koristi za ekstrakciju hlapljivih komponenti, uključujući eterična ulja, netopljivih u vodi, iz aromatičnog i ljekovitog bilja. Za razliku od destilacije vodenom parom, kod vodene destilacije uzorak je

direktno uronjen u vodu. Ova metoda je korisna za provođenje ekstrakcije eteričnih ulja manje gustoće jer se ovom metodom smanjuje količina spojeva eteričnog ulja koja zaostaje u vodenom ostatku destilacije (hidrolatu). Na tikvicu ispunjenu s prethodno izvaganim i osušenim biljnim materijalom i dodanom određenom količinom vode da prekrije biljni materijal se postavi aparatura po Clevenger-u (Slika 1). Na aparaturu se postavi kondenzator. Tikvica sa sadržajem se zagrijava do vrenja nakon čega se u aparaturi sakupljaja destilat koji sadrži eterično ulje te kondenzat, odnosno vodenu vazuu ili hidrolat. Destilat i kondenzat se odvajaju prema gustoći s obzirom da se te dvije faze se ne miješaju. Pažljivo se odvoji eterično ulje, a radi boljeg iskorištenja procesa moguće je ponoviti destilaciju s dobivenim hidrolatom.

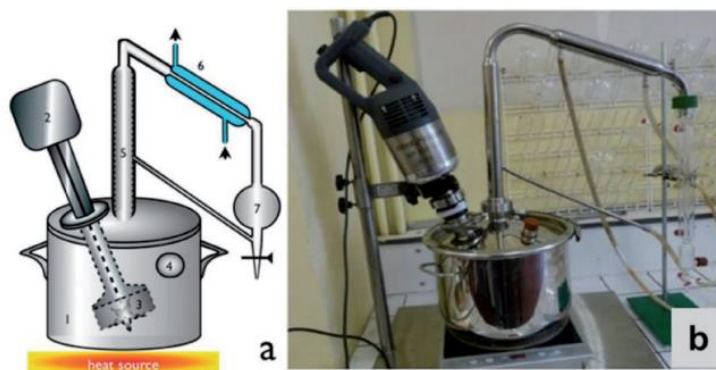


Slika 1. Aparatura po Clevenger-u (Tutek, 2017)

2.1.3. Turbodestilacija (turboliza)

Turbodestilaciju je patentirao Martel 1983. godine, a korištena je u nekoliko poduzeća za izdvajanje eteričnih ulja iz tvrdih materijala poput kore i sjemenke. Proces ekstrakcije je sličan vodenoj destilaciji, a dodane su male modifikacije procesu (Slika 2). Turbodestilacija se temelji na ekstrakciji uz miješanje i istovremeno smanjenje veličine čestica. Zbog jake smične sile, raspad biljnih stanica dovodi do brzog otapanja aktivnih sastojaka. To rezultira kraćim vremenom ekstrakcije i biljni materijal je gotovo potpuno iskorišten. U usporedbi s vodenom destilacijom, kod turbodestilacije je minimizirano vrijeme ekstrakcije i potrošnja energije, te su očuvani hlapljivi spojevi.

Martins i sur. su 2017. godine proučavali turbodestilaciju steviozida i rebaudiozida A iz osušenih listova bilje *Stevia rebusiana*, te je njihov rad pokazao obećavajuće rezultate za ekstrakciju glikozida. Uspoređujući s klasičnom vodenom destilacijom koja je trajala 3 sata, s turbodestilacijom rezultate je moguće dobiti u 30 minuta (Fongang i sur., 2021).



Slika 2. Laboratorijski turbo-Clevenger: (a) shema, (b) aparatura, posuda (1); rotor (2); turbo drobilica (3); termometar (4); kolona za destilaciju (5); kondenzator (6); prihvatni odjeljak/separator (7) (Fongang i sur., 2021)

2.1.4. Destilacija potpomognuta mikrovalovima

Biljni materijal se natopi u vodi te se podvrgava neionizirajućem mehanizmu mikrovalova. Dio apsorbirane elektromagnetske energije pretvara se u toplinsku i na taj način zagrijava smjesu. Ovom metodom se postiže visoko iskorištenje procesa, smanjuju se vrijeme trajanja ekstrakcije aktivnih tvari i uporaba otapala (Nayak i sur., 2015; Mandal i sur., 2007).

Destilacija potpomognuta mikrovalovima odvija se dielektričnim zagrijavanjem polarnog otapala čime zbog naglog porasta temperature i tlaka dolazi do pucanja staničnih struktura biljnog materijala čime se ekstrahiraju aktivne tvari u okolinu. Ioni migriraju elektroforetski djelovanjem izmjeničnog električnog polja; polarne molekule usmjeravaju se ovisno o jačini električnog polja te uslijed nemogućnosti prilagodbe električnim komponentama, djelovanjem sile trenja vibriraju pri čemu se razvija toplina, čime je omogućena ekstrakcija željenih aktivnih tvari iz biljnog materijala. Ovom metodom je važno postići optimalnu temperaturu radi smanjenja površinske napetosti i viskoznosti otapala u svrhu lakšeg prodiranja otapala kroz uzorak. Vrijeme ekstrakcije također igra važnu ulogu, jer iako se učinkovitost ekstrakcije povećava s vremenom trajanja procesa, termolabilni spojevi iz uzorka se degradiraju predugim izlaganjem povišenoj temperaturi (Mandal i sur., 2007). Snaga mikrovalova također mora biti regulirana kako bi se sačuvala osjetljive komponente. Optimalna veličina čestica biljnog materijala je od 100 μm do 2 mm pa se preporuča prethodno samljeti biljni materijal u fini prah.

2.2. Hidrolati

Hidrolati su nusproizvodi nastali tijekom ekstrakcije eteričnog ulja iz aromatičnog ili ljekovitog bilja. Nazivaju ih još hidrosol, aromatska voda, također i cvjetni destilat jer se sastoje od vode kondenzirane u procesu destilacije. Ta kondenzirana voda u sebi ipak sadrži vrlo malu količinu eteričnog ulja koje tom nusproizvodu daje određena senzorska svojstva. Hlapljive komponente eteričnog ulja otopljene u kondenzatu su hidrofilne i polarne molekule, što im omogućava da tvore vodikove veze s vodom. Hidrolati su smjesa vode i promijenjive količine eteričnog ulja (manje od 1 g L⁻¹) (Zheljazkov i Astatkie, 2011).

Za vrijeme industrijske destilacije, voda isparava istovremeno s eteričnim uljem. Nakon

kondenzacije para u dodiru s hladnim stijenkama cijevi i/ili posude, ukapljene komponente se razdvoje u dvije faze unutar sabirne posude, odnosno florentinske boce. Te dvije faze čine hidrolat i eterično ulje. Međutim, mala količina dragocjenih oksigeniranih komponenti eteričnog ulja se ipak otapa u hidrolatu dajući hidrolatu specifična organoleptička svojstva, kao i biološku aktivnost koja ih čini korisnima u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Aćimović i sur., 2020). Različiti hidrolati se koriste na tržištu, ponajviše kao sastojci kozmetičkih pripravaka, ali također i u proizvodnji hrane. Njihova popularnost je i dalje u porastu, a vrlo su traženi u aromaterapiji. Hidrolati u aromaterapiji pronalaze primjenu zbog svojih antibakterijskih, antifungalnih, antiseptičnih, analgetičkih i antioksidativnih svojstava. Također djeluju kao afrodizijak i pokazuju umirujuća svojstva (Baraa, 2021). Ovi prirodni proizvodi predstavljaju obećavajuće vrijedne izvore koji imaju potencijal biti kvalitetna sirovina za mnoge različite proizvode (Aćimović i sur., 2020).

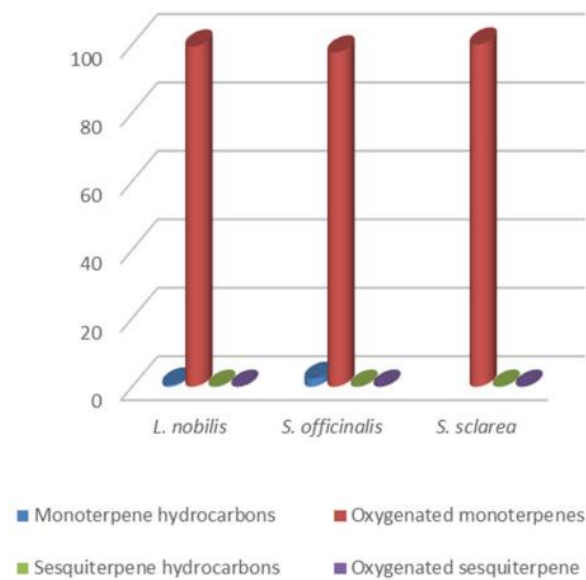
2.2.1. Kemijska svojstva hidrolata

Hidrolati obično sadrže manje od 1 g L^{-1} (odnosno manje od 10 %) aromatskih spojeva iz eteričnog ulja topivih u vodi koji zaostaju u vodenoj fazi nakon destilacije. Hidrolati koji sadrže oko 0,17 % aromatskih komponenti su vrlo aromatični i njihov sastav se uvelike razlikuje od sastava eteričnog ulja proizvedenog od istog materijala (Baydar i sur., 2013).

Hidrolati imaju pH vrijednost od 4,5 do 5,5, a kvaliteta im se određuje na temelju njihovih topljivih hlapljivih komponenti (Aazza i sur., 2012). Hlapljive komponente u hidrolatima su uglavnom polarniji spojevi kao što su monoterpenski alkoholi, aldehidi i ketoni, ali i seskviterpenski alkoholi (Slika 3). Općenito kemijska struktura spoja određuje sposobnost vezanja molekule vodikovim vezama za molekulu vode, a time i stupanj topljivosti neke molekule u vodi. U istraživanju koje su proveli Aćimović i sur. (2020) su uspoređeni kemijski sastavi eteričnih ulja i hidrolata dobivenih iz istog biljnog materijala i zaključeno je kako podudarnost u sastavu između eteričnog ulja i hidrolata ovisi uglavnom o odnosu ugljikovodika i oksigeniranih spojeva u eteričnom ulju. U uzorku u kojem dominira koncentracija oksigeniranih spojeva u eteričnom ulju, podudarnost sastava eteričnog ulja i hidrolata je visoka. Međutim, kada su ugljikovodici glavni sastojci eteričnog ulja, sastav hidrolata se drastično razlikuje od sastava eteričnog ulja.

Kemijske komponente koje se nalaze u hidrolatima pokazuju antioksidativno djelovanje,

iako slabije od eteričnih ulja. Međutim, prema različitim istraživanjima, hidrolati pokazuju visok potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji za aromatiziranje voćnih napitaka, slastica i bezalkoholnih pića, te za konzerviranje hrane i kao prikladno sredstvo za dezinfekciju pri pranju svježe rezanog voća i povrća. Osim toga, mogu se koristiti za dezinfekciju drugih prehrambenih proizvoda poput ribe i fermentiranih mesnih prerađevina. Nadalje, hidrolati se često koriste u kozmetici kao sastojak krema i losiona, te u parfemskoj industriji i u aromaterapiji.



Slika 3. Grafički prikaz udjela (%) terpenskih ugljikovodika u hidrolatima lovora i kadulje (Ovidi i sur., 2021)

2.3. Lovor

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je drvenasta višegodišnja zimzelena biljka iz istoimene porodice lovora (Lauraceae). Naraste do oko 15 m tvoreći gustu krošnju u područjima s toplom i vlažnom klimom. Listovi su tvrdi, kožasti, sjajni, aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem i zbog toga čest dodatak jelima. Također, listovi su jednostavni, bez palistića, eliptičnog oblika duljine 7-12 cm. Plodovi lovora su jednosjemene tamne izdužene bobice koje dozrijevaju u kasnu jesen (Slika 4).



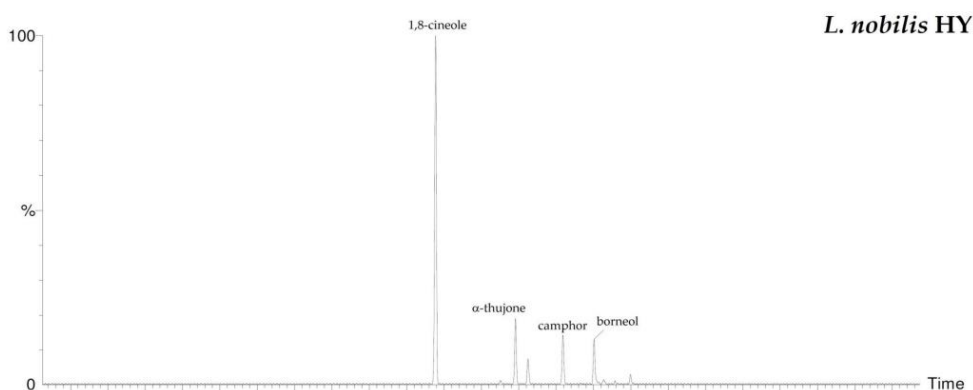
Slika 4. Biljka *Laurus nobilis* L. (Anonymus 1)

Fidan i sur. (2019) u istraživanju navode da list sadrži 3,25 % eteričnog ulja, dok grančice i plodovi sadrže tek oko 0,8 % eteričnog ulja. Najveći udio kemijskog sastava eteričnog ulja lovora čine monoterpeni s kisikom (60,32 %), od kojih je najzastupljeniji 1,8-cineol (eukaliptol) kojeg ima 19,56 % (Miljanović i sur., 2020).

2.3.1. Hidrolat lovora

U hidrolatu lista lovora, uz 1,8-cineol koji je najzastupljeniji (oko 65 %) (Ovidi i sur., 2021), nalaze se α -terpineol (10,6-13 %) i terpinen-4-ol (7,5-7,7 %) te mnogi fenoli koji imaju poznato antimikrobno i antioksidativno djelovanje (Lira i sur., 2008). Istraživanje Tornuk i sur., (2011) navodi da neki biološki aktivni spojevi (1,8-cineol, eugenol, linalol, β -selineol) čine hidrolat lovora dobrim dezinfekcijskim sredstvom za vrijeme pranja svježeg rezanog voća i povrća. Prisutnost fenolnih spojeva u eteričnom ulju i hidrolatu lovora kao što je 1,8-cineol u

određenim koncentracijama pokazuje antibakterijsko djelovanje (Baraa, 2021). Istraživanje koje su proveli Ghadiri i sur. (2014) pokazalo je antibakterijsku djelotvornost ekstrakta lovora za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *Staphylococcus aureus*, koja je čest uzročnik alimentarnih oboljenja. Također, Alejo-Armijo i sur. (2017) su pokazali kako lovor posjeduje brojna biološka svojstva, a antimikrobno djelovanje dokazano je na širokom spektru ljudskih patogenih mikroorganizama te na bakterijama kvarenja. Njegovo antimikrobno djelovanje povezuju s visokim udjelom 1,8-cineola, koji je utvrđeno koristan protiv razvoja biofilma formiranog sojevima otpornih na meticilin. Njegovo antibakterijsko djelovanje povećava se u kombinaciji karvakrolom.



Slika 5. HS/GC-FID kromatogram hidrolata lovora (Ovidi i sur., 2021)

2.4. Majčina dušica

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.), također poznata kao babja dušica, timijan i divlji bosiljak, trajni je grm iz porodice usnača (Lamiaceae) koji naraste do 20 cm. Ova nadzemna biljka raste samoniklo na suhim i sunčanim područjima, često u velikim skupinama. Listovi su unakrsno nasuprotni, sitni te jako variraju u obliku. Plod majčine dušice je kalavac koji se raspada na 4 sitna ploda (Slika 6).

Biljka se koristi za dobivanje visoko cjenjenog eteričnog ulja koje je obogaćeno glavnom komponentnom timolom, monoterpenoidom koji ima značajnu kliničku primjenu (Silva i sur., 2021).



Slika 6. Biljka *Thymus serpyllum* L. (Anonymus 2)

Majčina dušica se koristi u medicini već tisućama godina, poznata je po svom antimikrobnom, antivirusnom, spazmolitičkom i antioksidativnom djelovanju, a stari Grci su ju smatrali simbolom ljubavi, časti i sreće (Basch, 2004). Hidrolat ove biljke najviše se koristi u njezi kože.

2.4.1. Hidrolat majčine dušice

Hipertenzija je sve češći problem s kojim se suočava moderan čovjek zbog svakodnevnog izlaganja stresnim situacijama. Istraživanja su pokazala pozitivne učinke aromaterapije za smanjivanje visokog krvnog tlaka. Kemijski principi prirodnog izvora kao što su fenoli i flavonoidi mogu značajno pridonijeti smanjenju visokog krvnog tlaka, što su dokazali Mihailović i sur. (2013). Rezultati njihovog istraživanja su pokazali kako hidrolat majčine dušice djeluje antihipertenzivno kod spontano hipertenzivnih i normotenzivnih štakora.

Također, u istraživanju iz 2008. godine, Oral i sur. su ispitali antibakterijsko djelovanje hidrolata majčine dušice protiv bakterija *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens* koje su odgovorne za kvarenje slatkovodnih riba. Utvrđeno je da je hidrolat majčine dušice bio učinkovit protiv svih bakterija. Rezultati navedenog istraživanja ukazuju na to da bi hidrolat majčine dušice mogao naći primjenu u prehrambenoj industriji kao sredstvo za sprječavanje kvarenja prehrambenih proizvoda.

2.5. Ljekovita kadulja

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) je višegodišnja polugrmovita biljka iz iste porodice, kao prethodno spomenuta majčina dušica, usnača (Lamiaceae). Ljekovitu kadulju u narodu nazivaju i žalfija, odnosno šalvija. Ova biljka prirodno raste na kamenitim brdima priobalnog područja, a naraste do 40 cm. Listovi su jednostavni, duguljasti, sivozelene boje (Slika7). Razmnožava se sjemenom i vegetativno, a plod joj je kalavac koji se dijeli na manje tamnosmeđe oraščice.



Slika 7. Biljka *Salvia officinalis* L. (Anonymus 3)

Kadulja je poznata kao ljekovita i aromatična biljka koja ima svoju široku primjenu u proizvodnji hrane, parfema te biljnih lijekova i proizvoda. Neka znanstvena istraživanja su dokazale kako brojne vrste kadulje sadrže brojne spojeve koji pripadaju uglavnom skupinama fenolnih kiselina, fenolnih glikozida, flavonoida, antocijanina, terpenoida i dr. Ti spojevi u ekstraktima kadulje te eteričnim uljima kadulje imaju snažno antiradikalno djelovanje i visok antioksidativni kapacitet, a također i antibakterijska svojstva (Miladinović, 2000). Najpoznatija primjena hidrolata kadulje je liječenje problema usne šupljine, osim antibakterijskog i protuupalnog djelovanja, kadulja ima i analgetičko djelovanje koje pomaže pri zuboboljama i upalama grla.

2.5.1. Hidrolat kadulje

U istraživanju 2014. godine, Baydar i sur. su prikazali sastav hidrolata ljekovite kadulje. Hidrolat kadulje, koji je sadržavao 0,17 % eteričnog ulja kadulje zaostalog u vodenoj frakciji nakon destilacije, pokazao se jako aromatičan iako se njegov sastav uvelike razlikovao od sastava eteričnog ulja dobivenog tim postupkom. Nakon destilacije parom dobiveno je eterično ulje koje je sadržavalo čak 28 komponenti, dok je hidrolat sadržavao samo njih 8. Među tih 8 spojeva su bili: *cis*-tujon, *trans*-tujon, 1,8-cineol, kamfor, linalol, borneol, mirtenol i viridiflorol. Kamfor je bio dominantan spoj u hidrolatu kadulje, u udjelu od 43,38 %, Baydar i sur. (2014) zaključuju da je tako zbog visoke topljivosti kamfora u vodi. U nastavku je na slici 8 prikazana tablica spojeva hidrolata ljekovite kadulje preuzeta iz spomenutog istraživanja.

RI ^a	Components	Distillation and extraction products (%)			
		Essential oil	Hydrosol	Concrete	Absolute
1059	α -Pinene	2.80	tr	tr	0.20
1135	β -Pinene	2.53	tr	tr	tr
1221	Camphene	3.52	tr	0.98	0.27
1259	1,8-Cineole	17.93	23.99	18.31	6.51
1298	Sabinene	0.11	tr	tr	0.56
1324	γ -Terpinene	0.34	tr	tr	tr
1379	Myrcene	1.18	tr	tr	tr
1429	α -Terpinene	0.11	tr	tr	tr
1471	Limonene	1.83	tr	tr	tr
1691	p-Cymene	0.48	tr	tr	tr
1988	Camphor	19.93	43.38	27.00	19.92
2009	Linalool	1.10	2.70	6.84	11.44
2100	Linalyl acetate	0.73	tr	7.59	11.49
2163	<i>cis</i> -Thujone	20.06	15.46	13.97	11.16
2235	<i>trans</i> -Thujone	9.11	4.41	1.68	3.03
2275	Caryophyllene	4.41	tr	1.77	3.30
2498	α -Humulone	1.78	tr	tr	tr
2541	Borneole	4.56	7.66	7.93	8.12
2593	Terpineol	0.18	tr	tr	tr
2624	Bornyl acetate	1.28	tr	tr	0.90
2854	Myrtenol	0.51	0.55	tr	tr
2920	Verbenone	0.11	tr	tr	0.71
2938	Caryophyllene oxide	0.88	tr	3.55	4.55
2956	Humulone oxide	0.43	1.12	tr	1.94
2978	Viridiflorol	2.21	tr	8.72	10.95
	Total detected (%)	98.11	99.27	98.34	95.05
	Yield (%)	0.55	0.17	1.05	68.77

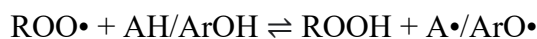
Slika 8. Sastav hlapivih komponenata eteričnog ulja, hidrolata, konkreta i apsoluta ljekovite kadulje (Baydar i sur., 2014)

2.6. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Ovisno o kemijskim reakcijama uključenima u proces, metode određivanja antioksidacijske aktivnosti mogu se podijeliti u dvije skupine: HAT (eng. *Hydrogen Atom Transfer*) koja se temelji na prijenosu vodika te SET (eng. *Single Electron Transfer*) koja se temelji na prijenosu elektrona (Munteanu i sur., 2021).

2.6.1. HAT metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

HAT metode su testovi temeljeni na prijenosu atoma vodika i mjere sposobnosti antioksidansa da ukloni slobodne radikale doniranjem vodikovog atoma. HAT mehanizmi antioksidacijskog djelovanja prikazani su u sljedećoj reakciji, gdje se atom vodika (H) iz fenola (ArOH) prenosi na peroksilni radikal :

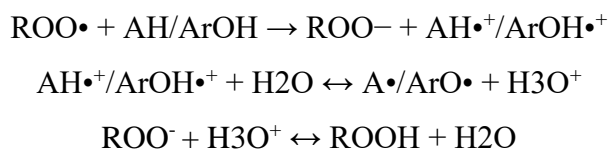


pri čemu se formira ariloksilni radikal (ArO•) koji se stabilizira rezonancijom, a AH su zaštićene biomolekule. Učinkovit fenolni antioksidans trebao bi reagirati brže sa slobodnim radikalima od zaštićenih biomolekula kako bi se postigao zaštitni učinak protiv radikala, odnosno njihove oksidacije.

Tipični primjeri metoda temeljenih na HAT-u su ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorption Capacity*), TRAP (eng. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i TOSC (eng. *Total Oxyradical Scavenging Capacity*) (Munteanu i sur., 2021).

2.6.2. SET metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Ove metode, također nazvane ET metode (eng. *Electron Transfer*), temeljene su na prijenosu jednog elektrona te identificiraju sposobnost antioksidansa da prenese elektron radi redukcije iona metala, karbonilnih skupina te slobodnih radikala. SET mehanizmi antioksidacijskog djelovanja mogu se sažeti sljedećim reakcijama:



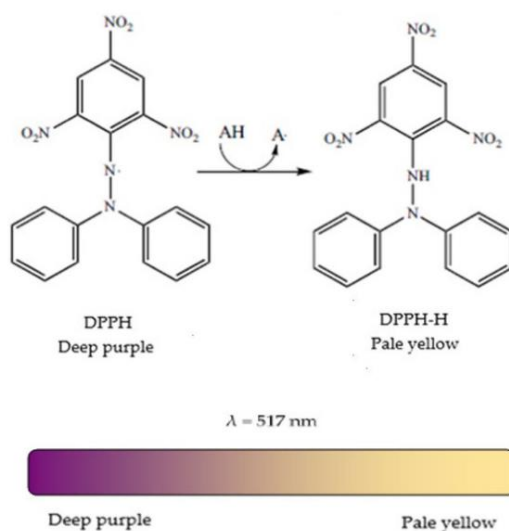
Relativna reaktivnost u SET metodama temelji se prvenstveno na deprotonaciji i ionizacijskom potencijalu reaktivne funkcijske skupine. Stoga su SET reakcije ovisne o pH. Ariloksilni radikal ($\text{ArO}\cdot$) se zatim oksidira do odgovarajućeg kinona ($\text{Ar}=\text{O}$). Što je ariloksilni radikal stabilniji, to je lakša oksidacija ArOH u $\text{Ar}=\text{O}$ zbog smanjenog redoks potencijala. Antioksidacijsko djelovanje u ovim metodama često je simulirano s prikladnim fluorescentnim ili obojenim uzorkom umjesto peroksilnih radikala.

Spektrosopske SET metode, uključujući Folin-Ciocalteuov test, DPPH, FRAP (eng. *Ferric Reduction of Antioxidant Power*) te testove smanjenja antioksidacijskog kapaciteta bakrovog (II) oksida (CUPRAC), mjere kapacitet antioksidansa da reducira oksidans što rezultira promjenom boje. Stupanj promjene boje direktno je povezan s koncentracijom ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (Munteanu i sur., 2021).

2.6.2.1. DPPH

DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrildirazil) je tamnoljubičastog obojenja i sparivanje njegovog nesparenog elektrona se očituje promjenom boje u žutu (Slika 9), što se spektrofotometrijski prati kao pad apsorbancije pri 517 nm. Topljiv je u različitim organskim otapalima ali ne i u vodi. Obično se otapa u metanolu, etanolu ili vodenim otopinama ovih alkohola. Kako bi se postigla bolja topljivost DPPH radikala, udio vode u smjesi ne smije biti viši od 60 %. Kod visokog sadržaja vode, tipični kvintetni spektar otopljenog DPPH \cdot se pretvara u singlet, oblik tipičan za radikal u čvrstom stanju. Takva modifikacija radikalne topljivosti nije uvijek vidljiva.

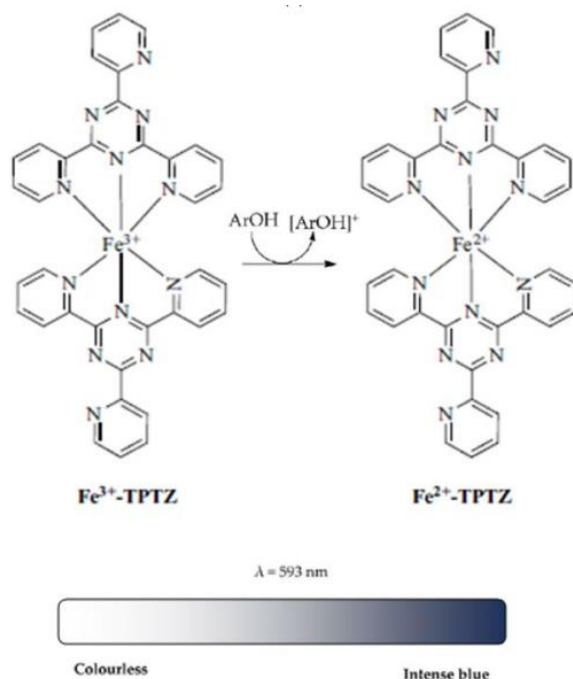
Prednosti ove metode očituju se u jednostavnosti izvedbe, pa se često koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (Brandwilliams i sur., 1995). Ipak, ova metoda nije prikladna za uzorke koji sadrže spojeve kao što su karotenoidi, čiji se apsorpcijski maksimum poklapa s onim DPPH radikala (Nomura i sur., 1997).



Slika 9. Mehanizam neutralizacije DPPH radikala djelovanjem antioksidansa (AH) (Munteanu i sur., 2021)

2.6.2.2. FRAP

Kod FRAP metode žuto obojeni kompleks TPTZ (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin) se reducira pri čemu nastaje plavo obojeni produkt (Slika 10) fero-tripiridintriazin intenziteta obojenja proporcionalnog koncentraciji antioksidanasa, kojeg očitavamo spektrofotometrijski pri 593 nm. Ovo je tipična SET metoda koja mjeri redukciju kompleksa željezov (III) ion – ligand u kompleks željezovog (II) iona intenzivno plave boje pomoću antioksidansa u kiselom mediju. Antioksidacijska aktivnost određuje se povećanjem apsorbancije na 593 nm, a rezultati su izraženi kao mikromolarni željezovi (II) ioni ($\mu\text{M Fe}^{2+}$) ili u odnosu na standardni antioksidans. Za razliku od drugih SET metoda, FRAP metodu je nužno provoditi u kiselim uvjetima (pH=3,6) da bi se održala topljivost željeza. Reakcija pri niskom pH smanjuje ionizacijski potencijal koji pokreće prijenos elektrona i povećava redoks potencijal, uzrokujući pomak u dominantnom reakcijskom mehanizmu (Munteanu i sur., 2021).



Slika 10. Kemijske strukture kompleksa uključenih u kemijskoj reakciji FRAP reagensom i promjena boje (Munteanu i sur., 2021)

2.6.3. TROLOX

Trolox (6-hidroksi-2,5,7-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) je u vodi topljiv analog vitamina E (α -tokoferola). Ima visoko antioksidativno djelovanje, reducira oksidativni stres u biološkim i biokemijskim reakcijama te se koristi kao standard pri određivanju antioksidacijskog kapaciteta. TEAC (eng. *trolox equivalent antioxidant capacity*) je mjera za antioksidativnu vrijednost temeljena na troloxu, a izražava se u ekvivalentima troloxa (TE).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Za proizvodnju hidrolata kao sekundarnih produkata koji nastaju pri proizvodnji eteričnih ulja korišten je osušeni, usitnjeni biljni materijal lovora, majčine dušice i kadulje. Lovor je ubran u okolini Rijeke u jesen 2020. i nabavljen od tvrtke Šafran d.o.o. (Zagreb, Hrvatska). Majčina dušica i ljekovita kadulja nabavljene su od tvrtke Suban d.o.o. (Strmec, Hrvatska).

3.2. Kemikalije i uređaji

Kemikalije

- 100 % -tni metanol (Lachner, Neratovice, Češka)
- DPPH (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
 - Priprema 0,2mM DPPH otopine
0,0079 g DPPH u prahu izvagano je u plastičnu lađicu te kvantitativno prenešeno u tikvicu od 100 mL koja je nadopunjena do oznake 100 %-tnim metanolom. Otopinu je potrebno čuvati u dobro zatvorenoj tikvici na tamnom mjestu.
 - Priprema FRAP reagensa
0,0312 g TPTZ u prahu izvagano je u plastičnu lađicu te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjeno 20 mM otopinom klorovodične kiseline do oznake, time dobivamo 10 mM otopinu TPTZ-a. U drugu plastičnu lađicu, za dobivanje 0,3 M acetatnog pufera, se dovaže 3,1 g natrij-acetat trihidrata te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 1 L, u koju se otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline te se nadopuni destiliranom vodom. Također se pripremi 20mM otopina željezo (III)-klorid heksahidrata na način da se 0,541 g željezovog (III)-klorida heksahidrata kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom. U staklenoj čaši od 50 mL se napravljeni reagensi pomiješaju za dobivanje FRAP reagensa, u omjeru 10:1:1, 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL otopine željezovog (III)-klorida heksahidrata.

- 37 % -tna klorovodična kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgija)
- željezo(III)-klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 99-100% -tna glacijalna octena kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrij-acetat trihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Uređaji i pribor

- Aparatura po Clevenger-u
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer) (VWR, Pennsylvania, SAD)
- Vortex uređaj MS2 Minishaker IKA (IKA, Staufen, Njemačka)
- Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g) (Mettler Toledo, Ohio, SAD)
- Analitička vaga Kern ABT 220-4M (Kern, Njemačka)
- Mikropipete, volumena 100 μ L i 1000 μ L
- Staklene epruvete
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 100 mL, 500 mL i 1 L
- Plastična lađica za vaganje
- Staklene kivete
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
- Stalak za epruvete

3.3. Metode rada

3.3.1. Proizvodnja hidrolata

Proizvodnja hidrolata slijedila je upute za ekstrakciju eteričnih ulja navedene u Europskoj farmakopeji. Pripravljena je suspenzija 20 g prethodno usitnjenog i osušenog biljnog materijala (lovor, majčina dušica, kadulja, te mješavina, 1:1:1) i 250 ml destilirane vode u okrugloj tikvici. Tikvica sa suspenzijom je postavljena na aparaturu po Clevenger-u (Slika 11) za provođenje te

je zagrijavana u grijaču do početka vrenja vode. Vodena destilacija se provodila 2 sata s brzinom destilacije 2-3 mL min⁻¹. Nastali hidrolat je sakupljan u Falcon kivete od 15 ml koje su zatim omotane parafilmom i skladištene na sobnoj temperaturi. Kivete su bile izložene danjem svjetlu.



Slika 11. Okrugla tikvica sa suspenzijom u aparaturi po Clevenger-u (vlastita fotografija)

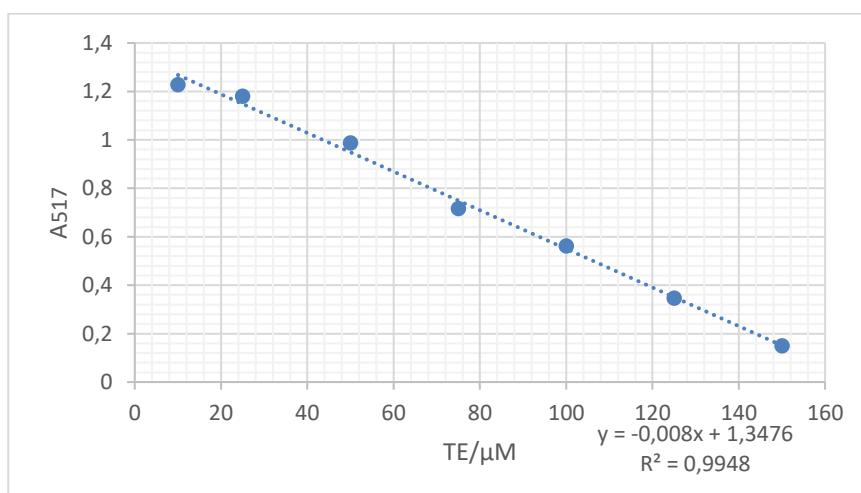
3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH metode se odredi na način da se u epruvetu 0,75 mL hidrolata i 1,5 mL 0,2mM otopine DPPH, dok se za slijepu probu koristi 2,25 mL 100 % metanola. Epruvete se zatim inkubiraju na 20 minuta u mraku, nakon čega se uzorcima izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm. Sva su mjerenja napravljena u paraleli.

Izrada baždarnog pravca za DPPH metodu:

Za pripravu baždarnog pravca koristi se otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). 0,025 g Troloxa se otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10, 25, 50, 100, 125, 150 μM . U epruvetu se otpipetira 0,75 mL odgovarajuće otopine Troloxa te 1,5 mL 0,2 mM otopine DPPH. Za slijepu probu u epruvetu se otpipetira 2,25 mL 100 % metanola. Epruvete sa sadržajem stoje 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Za određivanje antioksidativne stabilnosti, tijekom ovog istraživanja, mjerena je apsorbancija te preko baždarnih pravaca, za svaku od metoda, određena je vrijednost količine troloxa ($\mu\text{M L}^{-1}$). Koncentracija Troloxa je u direktnoj vezi sa antioksidativnom stabilnošću jer trolox uzimamo kao antioksidativni standard (Huang i sur., 2005).



Slika 12. Graf ovisnosti absorbancije (517 nm) o ekvivalentima troloxa za DPPH metodu

$$y = -0,008 x + 1,3476$$

$$R^2 = 0,9948$$

gdje je:

Y = apsorbancija uzorka pri 517 nm

X = ekvivalent troloxa (TAE) (μ M)

R^2 = koeficijent determinacije

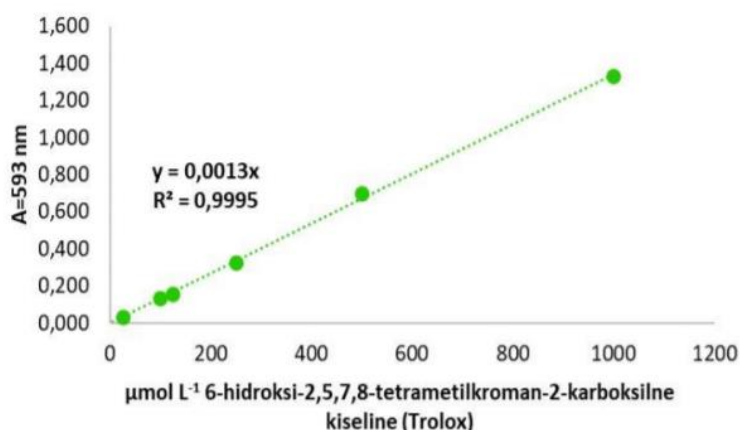
3.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta provodi se uz korištenje FRAP reagensa. Za pripremu uzoraka za mjerenje otpipetira se 240 μ L destilirane vode, 80 μ L hidrolata (ekstrakcijskog otapala za slijepu probu) i 2080 μ L FRAP reagensa. Sadržaj epruvete je potrebno dobro promiješati na uređaju Vortex, a potom na 5 min inkubirati na temperaturi od 37°C. Nakon toga, uzorcima se mjeri apsorbancija na spektrofotometru na 593 nm. Za svaki uzorak mjerenje je napravljeno u paraleli, te je uzeta srednja vrijednost.

Izrada baždarnog pravca za FRAP metodu:

Pripremi se otopina 2 mM Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenosi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 96 % EtOH. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom: 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5, 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice zatim se nadopunjavaju 96 % EtOH do oznake. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 μ M. Nakon toga u staklene epruvete se otpipetira 240 μ L destilirane vode, 80 μ L otopine standarda iz prethodno pripremljenih tikvica i 2080 μ L FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje pomoću Vortexa i termostatiranje pri 37 °C u kupelji rotavapora. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 96 % etanol. Iz izmjerenih vrijednosti izrađuje se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel

pri čemu se na apscisu nanose koncentracije troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom računa se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 13. Graf ovisnosti apsorbancije (593 nm) o ekvivalentima troloxa za FRAP metodu

$$y = 0,0013x$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 593 nm

X = $\mu\text{mol L}^{-1}$ ekvivalent askorbinske kiseline (AAE)

R^2 = koeficijent determinacije

3.3.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je u programu Microsoft Excel gdje su izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije mjerenja antioksidacijske aktivnosti DPPH i FRAP metodom te izrađeni grafički prikazi rezultata i baždarni pravci, dok je korelacija rezultata dobivenih određivanjem DPPH i FRAP metodom izračunata u programu Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Antioksidacijska aktivnost izvornih hidrolata određena DPPH i FRAP metodom

Nakon što je spektrofotometrijski određena absorbancija za svaki uzorak, preko baždarnih pravaca (slike br. 12 i 13) određena je antioksidacijska aktivnost izražena u μM ekvivalenata Troloxa (TE) za svaki uzorak. Uzeta je srednja vrijednost dvaju mjerenja za svaki uzorak hidrolata. Rezultati su prikazani u tablici 1 kao srednja vrijednost dvaju mjerenja \pm standardna devijacija.

Tablica 1. Antioksidacijska aktivnost uzoraka hidrolata biljaka *Laurus nobilis* L. , *Thymus serpyllum* L. , *Salvia officinalis* L. i mješavine na 0. dan (izvorni uzorak)

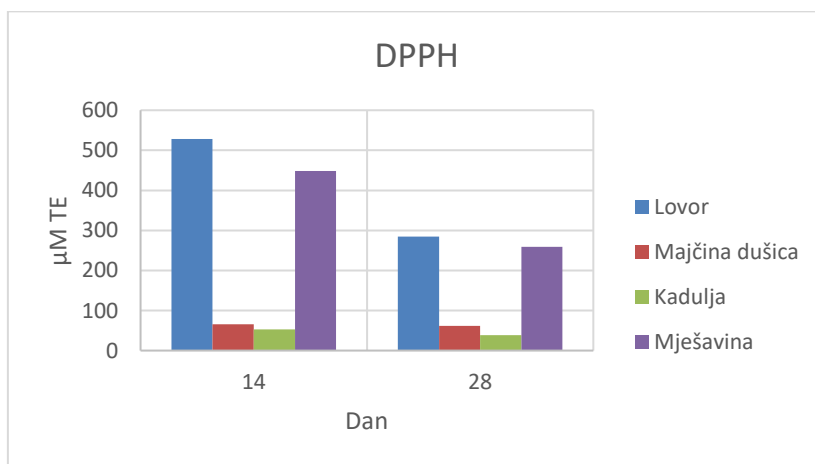
	<i>Laurus nobilis</i> L.	<i>Thymus serpyllum</i> L.	<i>Salvia officinalis</i> L.	Mješavina 1:1:1
metoda	$\mu\text{M TE} \pm \text{st. dev.}$			
DPPH	667,56 \pm 11,9324	111,08 \pm 1,0606	68,45 \pm 4,0658	621,63 \pm 19,4454
FRAP	2028,85 \pm 78,8696	371,15 \pm 8,1589	58,46 \pm 3,2635	1065,39 \pm 5,4393

Hidrolat lovora 0. dan pokazao je najveću antioksidacijsku aktivnost, a slijedili su ga mješavina biljaka, majčina dušica i kadulja. Moguće je da je za visoku antioksidacijsku aktivnost lovora odgovoran sadržaj 1,8-cineola koji je u hidrolatu prisutan u visokoj koncentraciji za razliku od antioksidanasa dominantnih u drugim uzorcima, poput kamfora i timola koji su slabije topljivi u vodi od 1,8-cineola (Maleš i sur., 2022). Antioksidacijska aktivnost hidrolata se zbog svog sastava i topljivih komponenti razlikuje od eteričnog ulja iste biljke, odnosno pokazuje niže vrijednosti (Ojeda-Sana i sur., 2013). U istraživanju iz 2022. godine, Maleš i sur. su proučavali hlapljive i nehlapljive komponente u ekstraktima lovora, majčine dušice i ljekovite kadulje. Monoterpeni su bili najčešći izolirani hlapljivi organski spojevi u proučavanim ekstraktima. Oksigenirani monoterpeni poput α - i β -tujona, 1,8-cineola i kamfora su bili dominantne komponente u vodenim ekstraktima, što se također može povezati i sa sastavom hidrolata tih biljaka. U hidrolatu lovora, u najvećoj koncentraciji je prisutan 1,8-cineol, dok se u eteričnom ulju lovora nalaze i linalol i metil eugenol u visokim

koncentracijama ali zbog svoje netopljivosti u vodi ne zaostaju u hidrolatu. U hidrolatu ljekovite kadulje zaostaju 1,8-cineol i kamfor, u puno većoj koncentraciji nego u eteričnom ulju upravo zbog svoje dobre topljivosti u vodi. Iako je u ekstraktu majčine dušice dominantna komponenta karvakrol koji je slabo topljiv u vodi, u hidrolatu biljke dominira timol. Razlika u antioksidacijskoj stabilnosti između hidrolata kadulje i majčine dušice se može objasniti jačim antioksidacijskim djelovanjem timola u usporedbi s kamforom, što su uočili Lin i sur. (2009) prilikom usporedbe antioksidacijske aktivnosti glavnih komponenti različitih eteričnih ulja DPPH metodom gdje se timol pokazao boljim antioksidansom od kamfora.

Prema Maleš i sur. (2022), dominantne komponentne vodenog ekstrakta mješavine lovora, majčine dušice i kadulje u jednakom omjeru su β -tujon i 1,8-cineol. S obzirom na to da su tujoni slabo topljivi u vodi, glavna komponenta hidrolata mješavine je 1,8-cineol što objašnjava njegovu visoku antioksidacijsku stabilnost.

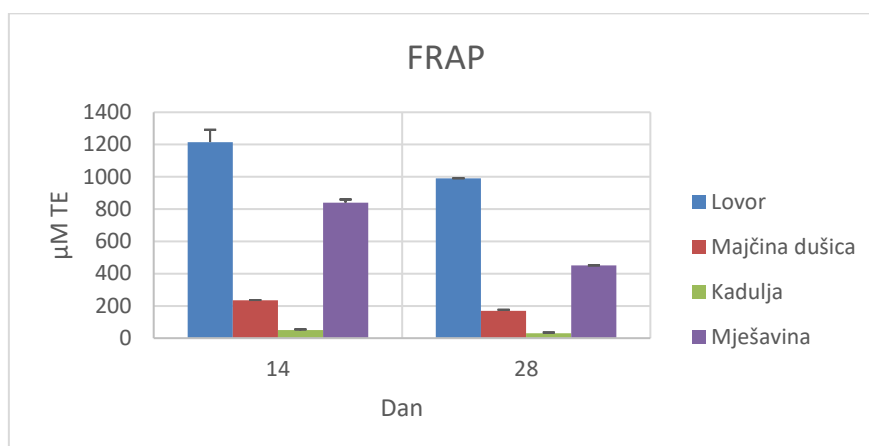
4.2. Antioksidacijska stabilnost hidrolata tijekom 28 dana određena DPPH i FRAP metodom



Slika 14. Grafički prikaz antioksidacijske stabilnosti hidrolata prema DPPH metodi

Uzorak hidrolata lovora 0. dan pokazuje vrijednost antioksidacijske aktivnosti od 667,56 $\mu\text{M TE}$ koja nakon 28 dana pada na 284,65 $\mu\text{M TE}$. Uzorak hidrolata majčine dušice pokazuje vrijednost antioksidacijske aktivnosti čak šest puta manju nego hidrolat lovora, 111,08 $\mu\text{M TE}$ prvog dana, a koja nakon 28 dana pada na 61,51 $\mu\text{M TE}$. Najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti ima uzorak hidrolata ljekovite kadulje koja prvog dana iznosi 68,45

$\mu\text{M TE}$ te se nakon 28 dana smanjuje na $38,70 \mu\text{M TE}$.



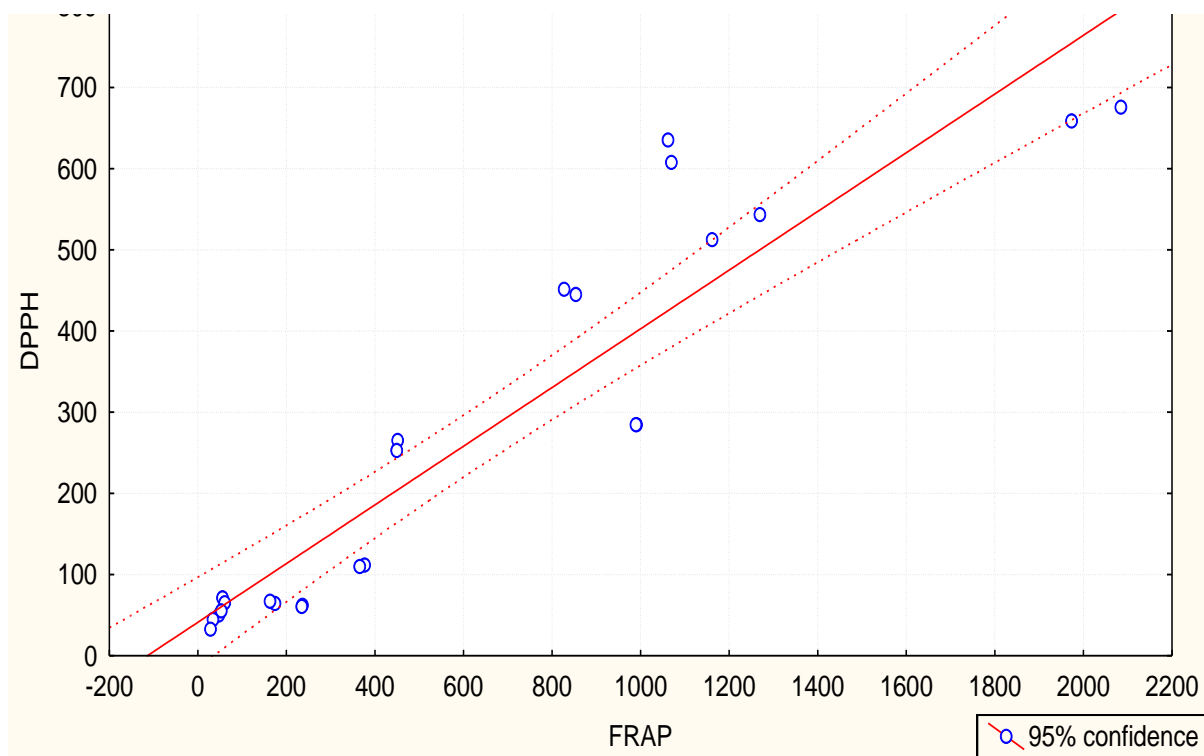
Slika 15. Grafički prikaz antioksidativne stabilnosti hidrolata prema FRAP metodi

Uzorak hidrolata lovora 0. dan pokazuje vrijednost antioksidacijskog kapaciteta od $2028,85 \mu\text{M TE}$ koja nakon 28 dana pada na $990,0 \mu\text{M TE}$. Uzorak hidrolata majčine dušice pokazuje vrijednost antioksidacijske aktivnosti čak pet puta manju nego hidrolat lovora, $371,15 \mu\text{M TE}$ prvog dana koja nakon 28 dana pada na $168,46 \mu\text{M TE}$. Najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti ima uzorak hidrolata ljekovite kadulje koja prvog dana iznosi $58,46 \mu\text{M TE}$ te na kraju eksperimenta pada na $31,15 \mu\text{M TE}$.

Prema dobivenim rezultatima, primjetno je da svi uzorci slijede isti trend. Antioksidacijska aktivnost hidrolata se smanjuje do otprilike 50 % početne vrijednosti nakon 28 dana što upućuje na degradaciju određenih spojeva prisutnih u hidrolatima. Hidrolatima je mjerena antioksidacijska stabilnost 14. dana kada se većini uzoraka antioksidacijska aktivnost smanjila za 20 %, osim kod uzorka hidrolata majčine dušice čija se antioksidacijska aktivnost smanjila za 40 %. Kod ostalih uzoraka veći gubitak antioksidacijske aktivnosti se događa između 14. i 28. dana. U istraživanju koje su proveli Kayahara i sur. (2000) pokazalo se kako tijekom prvih nekoliko dana skladištenja dolazi do degradacije spojeva zaslužnih za antioksidacijsku aktivnost te gubitka hlapivih spojeva odgovornih za aromu hidrolata različitih začinskih biljaka, uključujući *Salvia officinalis* L. Slične rezultate dobili su Katalinić i sur. (2006) dok su koristeći se FRAP metodom ispitali ukupan broj fenola i antioksidacijski kapacitet kod 70 vrsta ljekovitog bilja, uključujući majčinu dušicu i ljekovitu kadulju. Moguće

je da je za degradaciju hlapivih spojeva zaslužan način skladištenja kiveta koje nisu bile izolirane od djelovanja sunčeve svjetlosti, što je također moglo dovesti do degradacije antioksidativnih komponenti hidrolata (Vrbikova i sur., 2014) zbog čega se s vremenom smanjila antioksidativna stabilnost. To je najčešći način skladištenja hidrolata na policama u trgovinama te bi pakiranje hidrolata u zatamnjanim bocama potencijalno moglo produžiti vrijeme antioksidacijske stabilnosti hidrolata.

4.3. Korelacija rezultata dobivenih DPPH i FRAP metodom



Slika 16. Graf korelacije rezultata antioksidacijske aktivnosti dobivenih DPPH i FRAP metodama

Koeficijent determinacije R^2 iznosi 0,8591, koeficijent korelacije r je 0,9269. Statistička značajnost koeficijenta korelacije je $p \leq 0,05$, zbog čega se može reći da je koeficijent korelacije statistički značajan i da se radi o jakoj pozitivnoj korelaciji ($0,8 < r < 1$). To znači da obje metode pokazuju isti trend u rezultatima. Jednak trend zabilježili su Ahoua i sur. (2012) te Clarke i sur. (2013) prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti različitih vrsta fikusa i biljaka malazijske šume DPPH i FRAP metodama.

5. ZAKLJUČAK

1. Među ispitivanim hidrolatima najveća antioksidacijska aktivnost primjenom obje metode određena je u hidrolatu lovora i iznosila je oko 2000 $\mu\text{M TE}$. Hidrolat biljne mješavine ovih biljaka pomiješanih u omjeru 1:1:1 imao je duplo manju antioksidacijsku aktivnost, dok je hidrolat majčine dušice imao pet puta, a hidrolat kadulje čak tridesetak puta manju antioksidacijsku aktivnost.
2. Nakon 28 dana skladištenja hidrolata pri sobnoj temperaturi, antioksidacijska aktivnost svih hidrolata smanjila se na približno 50% početne vrijednosti.
3. Rezultati dobiveni DPPH i FRAP metodama pokazuju statistički značajan koeficijent korelacije, tj. obje metode pokazuju isti trend promjena antioksidacijske aktivnosti hidrolata lovora, majčine dušice, kadulje i biljne mješavine navedenih biljaka tijekom skladištenja.
4. Budući da je antioksidacijska aktivnost hidrolata lovora i nakon 28 dana skladištenja pri sobnoj temperaturi bila visoka, hidrolat pokazuje potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji, primjerice u minimalnoj preradi svježeg voća i povrća radi prevencije kvarenja te produljenja roka trajanja.

6. LITERATURA

Aazza S, Badiâ L, Maria GM (2011) Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols. *J Med Plant Res* **5(30)**, 6688-6696. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1176>

Ăcimović MG, Tešević VV, Smiljanić KT, Cvetković MT, Stanković JM, Kiprovska BM i sur. (2020) Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Adv Technol* **9(2)**, 54-70. <https://doi.org/10.5937/savteh2002054A>

Ahoua ARC, Koné MW, Konan AG, Bonfoh B, Tra FH (2012) Antioxidant activity of eight plants consumed by Great Apes in Côte d'Ivoire. *Afr J Biotechnol* **11(5)**, 11732-11740. <https://doi.org/10.5897/AJB12.236>

Alejo-Armijo A, Altarejos J, Salido S (2017) Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis*). *Nat Prod Commun* **12(5)**, 743-757. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200519>

Anonymus 1, <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/11/lovor-6.jpg>, pristupljeno 17.05.2022.

Anonymus 2, <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/07/majcina-dusica-0001.jpg>, pristupljeno 17.05.2022.

Anonymus 3, <https://www.mojvrt.hr/wp-content/uploads/2021/04/kadulja-biljka.jpg>, pristupljeno 17.05.2022.

Aydin S, Caniklioğlu A (2021) Antimicrobial and antioxidant potentials, total phenolic contents of some herbal waters. *Eur J Biol Res* **11(2)**, 203-211. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4501542>

Azmir J, Zaidul ISM., Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117(4)**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Baara M (2021) Review on the medicinal properties of some aromatic hydrosols. *Zeugma Biological Science* **2(1)**, 1-19. <https://www.researchgate.net/publication/349589991>

Basch E, Ulbricht C, Hammerness P, Bevins A, Sollars D (2004) Thyme (*Thymus vulgaris* L.), thymol. *J Herb Pharmacother* **4(1)**, 49-67. https://doi.org/10.1300/J157v04n01_07

Baydar H, Sangun MK, Erbas S, Kara N (2013) Comparison of Aroma Compounds in Distilled and Extracted Products of Sage (*Salvia Officinalis* L.). *J Essent Oil-Bear Plants* **16(1)**, 39–44. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.764175>

Brandwilliams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci Technol* **28(1)**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Clarke G, Ting K, Wiart C, Fry J (2013) High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants* **2(1)**, 1–10. <https://doi.org/10.3390/antiox2010001>

Conde-Hernández LA, Espinosa-Victoria JR, Trejo A, Guerrero-Beltran JA (2016) CO₂-Supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *J Food Eng* **200**, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022>

Conforti F, Statti G, Uzunov D, Menichini F (2006) Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol Pharm Bull* **29(10)**, 2056–2064. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2056>

Dall'Acqua S, Cervellati R, Speroni E, Costa S, Guerra M, Stella L i sur. (2009) Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *J med food* **12(4)** 869-76. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0119>

D'Amato S, Serio A, Lòpez C, Paparella A (2017) Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control* **86**. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>

Elyemni M, Louaste B, Nechad I, Elkamli T, Bouia A, Taleb M i sur. (2019) Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *Sci World J* **4**, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>

Fongang FYS, Bankeu KJJ, Gaber ESB, Iftikhar A, Lenta NB (2021) Natural Medicinal Plants, El-Shemy H, London, str. 148-178. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>

Ghadiri E, Ahmadi R, Moridikyia A, Mahdavi E, Tavakoli P (2014) *Laurus nobilis* Has Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus*. International Conference on Food, Biological and Medical Sciences (FBMS-2014), Bangkok, 75-76. <https://doi.org/10.5897/AJMR2020.9405>

Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, Trst. https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf

Huang D, Ou B, Prior R (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J agric food chem* **53(6)**, 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M (2006) Screening of 70 medicinal Plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* **94(4)**, 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>

Kayahara H, Kogiso K, Kawakami A, Ohba T (2000) Evaluations of aromatic aging in the herb waters. *Aroma Res* **1(1)**, 44-49.

Li X, Wu X, Huang L (2009) Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). *Molecules* **14(12)**, 5349-5361. <https://doi.org/10.3390/molecules14125349>

Lin CW, Yu CW, Wu SC, Yih KH (2009) DPPH Free-Radical Scavenging Activity, Total Phenolic Contents and Chemical Composition Analysis of Forty-Two Kinds of Essential Oil. *J Food Drug Anal* **17(5)**, 386-395. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.05.007>

Lira PDL, Retta D, Tkacik E, Ringuélet J, Coussio JD, Van Baren C, Bandoni AL (2009)

Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. *Ind Crops Prod* **30(2)**, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.04.005>

Maleš I, Dragović-Uzelac V, Jerković I, Zorić Z, Pedisić S, Repajić M i sur. (2022) Non-Volatile and Volatile Bioactives of *Salvia officinalis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Laurus nobilis* L. Extracts with Potential Use in the Development of Functional Beverages. *Antioxidants* **11(6)**, 1140. <https://doi.org/10.3390/antiox11061140>

Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn rev* **1(1)**, 7-18.

Mannan A, Inayatullah S, Akhtar MZ, Qayyum M, Mirza B (2009). Biological evaluation of wild thyme (*Thymus serpyllum*). *Pharm Biol* **47(7)**, 628–633. <https://doi.org/10.1080/13880200902915622>

Mihailovic-Stanojević N, Belščak-Cvitanović A, Grujić-Milanović J, Ivanov M, Jovović D, Bugarski D i sur. (2013). Antioxidant and Antihypertensive Activity of Extract from *Thymus serpyllum* L. in Experimental Hypertension. *Plant Food Hum Nutr* **68(3)**, 235–240. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0368-7>

Miladinović D, Miladinović Lj (2000) Antimicrobial Activity of Essential Oil of Sage from Serbia. *FU Phys Chem Tech* **2(2)**, 97-100. <http://facta.junis.ni.ac.rs/phat/phat2000/phat2000-05.pdf>

Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **22(7)**, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O i sur. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem* **187**, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>

Nikolic M, Glamoclija J, Ferreira IC, Calhella RC, Fernandes Â, Markovic T i sur. (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Ind Crop Prod*

52, 183–190. <https://core.ac.uk/download/pdf/153410622.pdf>

Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Int J Biochem Mol* **42(2)**, 361-370. <https://doi.org/10.1080/15216549700202761>

Ojeda A, Van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S (2013) New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food control* **31(1)**, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>

Oliveira BPP, Rodrigues F (2018) Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics*, posebno izd., Portugal <https://www.mdpi.com/books/pdfdownload/book/741>

Ovidi E, Laghezza Masci V, Zambelli M, Tiezzi A, Vitalini S, Garzoli S (2021) *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities. *Plants* **10(4)**, 707. <https://doi.org/10.3390/plants10040707>

Patel K, Panchal N, Ingle P (2019) Techniques Adopted for Extraction of Natural Products. *Int J Adv Res Chem Sci* **6(4)**, 1-12. <https://www.arcjournals.org/pdfs/ijarcs/v6-i4/1.pdf>

Perino S, Chemat-Djenni Z, Petitcolas E, Ginies C, Chemat F (2019) Downscaling of Industrial Turbo-Distillation to Laboratory Turbo-Clevenger for Extraction of Essential Oils. Application of Concepts of Green Analytical Chemistry. *Molecules* **24(5)**, 2734. <https://doi.org/10.3390/molecules24152734>

Silva AS, Tewari D, Sureda A, Suntar I, Belwal T, Battino M i sur. (2021) The evidence of health benefits and food applications of *Thymus vulgaris*. *Trends Food Sci Technol* **117**, 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.010>

Thaiponga K, Boonprakoba U, Crosbyb K, Cisneros-Zevallosc L, Byrne DH (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compost Anal* **19(6-7)**, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

Tornuk F, Cankurt H, Ozturk I, Sagdic O, Bayram O, Yetim H (2011) Efficacy of various plant

hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *Int J Food Microbiol* **148(1)**, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.022>

Vrbíková L, Schmidt Š, Kreps F, Tmáková L, Čertík M, Sekretár S (2014) Degradation of selected nutrients in sunflower oils during long-term storage. *Czech J Food Sci* **32(6)**, 595–600. <https://doi.org/10.17221/176/2014-CJFS>

Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC i sur. (1998) Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* **46(12)**, 4869–4873. <https://doi.org/10.1021/np980436g>

Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin med* **13(1)**, 1-26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zheljazkov VD, Astatkiec T (2011) Effect of residual distillation water of 15 plants and three plant hormones on Scotch spearmint (*Mentha × gracilis* Sole). *Ind Crop Prod* **33(3)**, 704–709. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.011>

Izjava o izvornosti

Ja Laura Majerić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis