

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno - biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Elena Mikolaj**

6798/PT

**EKSTRAKCIJA LIGNANA I FENOLNIH  
KISELINA IZ POGAČE LANA  
ZAVRŠNI RAD**

**Rad izrađen u sklopu HRZZ projekta br. 9550 – Zelena otapala za zelene tehnologije**

**Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Škevin**

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju ulja i masti**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### **EKSTRAKCIJA LIGNANA I FENOLNIH KISELINA IZ POGAČE LANA**

*Elena Mikolaj, 0058204248*

#### **Sažetak:**

Lan se smatra najbogatijim biljnim izvorom lignana prema visokom sadržaju sekoizolarikirezinol diglukozida (SDG), uz manje količine fenolnih kiselina. Pogača lana, koja je nusproizvod nakon prešanja, može poslužiti kao dobra sirovina za njihovu ekstrakciju. Cilj ovog rada bio je odrediti koncentracije lignana i fenolnih kiselina u pogači lana te ispitati utjecaj različitih otapala na njihovu izolaciju. Provedena je ekstrakcija na planskoj tresilici s dva različita otapala (70 % MetOH + 30 % 0,1 M NaOH i 70 % MetOH + 30 % 1 M NaOH). Dobiveni rezultati pokazali su da je najveća koncentracija SDG-a ekstrahirana s otapalom manje molarnosti NaOH, a za ekstrahiranje fenolnih kiselina kao učinkovitije otapalo pokazalo se ono veće molarnosti NaOH.

**Ključne riječi:** lan, pogača lana, lignani, fenolne kiseline, ekstrakcija

**Rad sadrži:** 29 stranica, 9 slika, 3 tablice, 48 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagreb**

**Mentor:** *prof. dr. sc. Dubravka Škevin*

**Pomoć pri izradi:** *dr. sc. Marko Obranović*

**Datum obrane:** 7. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Oil and Fat Technology**

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

### EXTRACTION OF LIGNANS AND PHENOLIC ACIDS FROM FLAXSEED CAKE

*Elena Mikolaj, 0058204248*

#### **Abstract:**

Flaxseed is considered the richest plant source of lignans by high content of secoisolariciresinol diglucoside (SDG), with fewer amounts of phenolic acids. Flaxseed cake, as a by-product after oil pressing, can serve as good source for their extraction. The aim of this study was to determine the concentrations of lignans and phenolic acids in the flaxseed cake and to examine the influence of different solvents on their isolation. Extraction was performed on a planar shaker with two different solvents (70% MetOH + 30% 0.1 M NaOH and 70% MetOH + 30% 1 M NaOH). The results obtained showed that the largest concentration of SDG was extracted with a less molar solvent of NaOH, and the higher molar solvent of NaOH has shown more efficient for the phenolic acids.

**Keywords:** flax, flaxseed cake, lignans, phenolic acids, extraction

**Thesis contains:** 29 pages, 9 figures, 3 tables, 48 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *Dubravka Škevin, PhD.*

**Technical support and assistance:** *Marko Obranović, PhD.*

**Defence date:** July 7<sup>th</sup> 2017

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Lan.....	2
2.1.1. Laneno ulje .....	3
2.1.2. Pogača lana.....	5
2.2. Fenolni spojevi .....	6
2.2.1. Lignani .....	7
2.2.2. Fenolne kiseline.....	9
2.2.3. Utjecaj na zdravlje .....	10
2.3. Metode ekstrakcije .....	11
2.3.1. Ekstrakcija organskim otapalima .....	11
2.3.2. Nove metode ekstrakcije .....	12
2.4. HPLC.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
3.1. Materijali i metode .....	16
3.1.1. Uzorak.....	16
3.1.2. Reagensi i standardi .....	16
3.1.3. Aparatura.....	16
3.1.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva pogače na tresilici .....	17
3.1.5. Određivanje sastava fenolnih spojeva putem HPLC-a .....	17
3.2. Rezultati i rasprava .....	18
4. ZAKLJUČAK.....	24
5. POPIS LITERATURE.....	25

# 1. UVOD

Lan je jednogodišnja biljka koja se najčešće uzgaja za dobivanje tekstilnog vlakna i proizvodnju ulja. Nutritivna vrijednost sjemenki lana očituje se u sastavu lignana, topivih vlakna, tokoferola, sterola i polinezasićenih masnih kiselina, te je jedan od najbogatijih prehrambenih izvora esencijalne  $\alpha$ -linolenske masne kiseline. Posljednjih godina povećala se popularnost uljanog lana koji ima povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje – pozitivan učinak na probavni i krvožilni sustav te na cjelokupni imunitet. Prešanjem lanenog sjemena može se proizvesti hladno prešano ulje na temperaturi do 50 °C ili nerafinirano ulje uz primjenu povišenih temperatura.

Pogača lana je nusproizvod, odnosno kruti ostatak nakon prešanja koji se donedavno uglavnom smatrao otpadom i beskorisnim ostatkom, no danas se koristi u različite svrhe i privlači interes industrije i znanstvene zajednice. Koristi se kao stočna hrana, ima velik potencijal i u prehrani ljudi, a može služiti i za izolaciju lignana, proteina i polisaharida kojima je bogata.

Lan se smatra najbogatijim biljnim izvorom lignana prema visokom sadržaju sekoizolarikirezinol diglukozida (SDG), a sadrži i velike količine fenolnih kiselina kao sastojaka hrane s antioksidativnom aktivnošću.

Zbog svoje hidrofilnosti fenolni spojevi su izrazito slabo topivi u ulju pa zaostaju u pogači nakon prešanja ulja. Visoke koncentracije fenolnih spojeva čine pogaču lana dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju koja se najčešće provodi organskim otapalima. Dosadašnja dugotrajna istraživanja pokazala su velik interes za iskorištavanje vrijednih spojeva iz lanene pogače te su usmjerena prema otkrivanju bržih i ekološki prihvatljivijih metoda ekstrakcije.

Cilj ovog istraživačkog rada je odrediti udio lignana i fenolnih kiselina u pogači lana te izabrati najbolja otapala za njihovu izolaciju iz pogače lana. Namjena je poboljšati i ubrzati postupak izolacije i detekcije fenolnih spojeva pomoću inovativnih i efikasnijih metoda ekstrakcije uz primjenu mikrovalova i ultrazvuka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lan

Lan (lat. *Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka koja se najčešće uzgaja za dobivanje tekstilnog vlakna i radi proizvodnje sjemena i ulja. Pripada porodici *Linaceae*, rodu *Linum* koja ima više od 200 različitih vrsta, a uglavnom je raširen u umjerenom i subtropskom području sjeverne polutke. Potječe iz Mezopotamije, a komercijalno se uzgaja uglavnom u Kini, Kanadi, Indiji, SAD-u, Argentini, Ukrajini, Francuskoj, Belgiji, Etiopiji, Rusiji i Australiji. Prema FAO statistikama iz 2014. godine, laneno ulje nalazi se na 12. mjestu u ukupnom udjelu svjetske proizvodnje sa 686 498 t (0,35%). Sorta koja se koristi za dobivanje ulja iz sjemena – uljani lan, ima uspravnu, glatku i u gornjem dijelu razgranatu stabljiku koja naraste do 80 cm visine. Prepoznatljiv je po uskim listovima i zrakasto simetričnim, peteročlanim, modrim i ljubičastim cvjetovima (Slika 1). Lan može imati 35-50 plodova tzv. okruglastih peterogradnih tobolaca zaobljenih pri vrhu koji sadrže do 10 sjemenki. Nutritivne komponente sjemenki lana su ulje, proteini (oko 20%), lignani, topiva vlakna (oko 30%), minerali i vitamini, a sjeme lana sadrži oko 40% ulja (od toga oko 73% polinezasićenih masnih kiselina, te je jedan od najbogatijih prehrambenih izvora esencijalne  $\alpha$ -linolenske masne kiseline) (Sharav i sur., 2013). Posljednjih godina povećala se popularnost uljanog lana koji ima povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje zbog visokog udjela omega-3 masnih kiselina, sadržaja vlakana, proteina, minerala, vitamina i antioksidansa. Pokazalo se da djeluju pozitivno na probavni i krvožilni sustav i na cjelokupni imunitet.



Slika 1. Biljka lana (Anonymus 1, 2017)

### 2.1.1. Laneno ulje

Prešanjem lanenog sjemena može se proizvesti hladno prešano ili nerafinirano ulje uz primjenu povišenih temperatura. Laneno ulje koje se koristi za ljudsku prehranu je hladno prešano te nikakvi dodaci u njemu nisu dozvoljeni. Prema industrijskim standardima hladno prešanje se provodi kada temperatura proizvodnog procesa ne prelazi 50°C (Pravilnik, 2012). Tehnologija proizvodnje ulja započinje s pripremom sjemena što uključuje uklanjanje nečistoća ispod 1% i podešavanje udjela vode na 9,5-10%. Optimalni udio vode minimalizira stvaranje finih čestica nakon mljevenja i pomaže postizanju maksimalnog iskorištenja (Przybylski, 2005). Sjemenke s optimalnom vlažnosti zatim se melju pomoću rotirajućih valjaka kako bi se razorile stanice biljnog tkiva i time postiglo lakše izdvajanje ulja. Potrebno je mljeti do optimalne veličine (presitno samljevena sirovina otežava cijedenje ulja) i mljeti jednoliko jer se tako održava konstantan režim daljnje prerade. Prešanje se uglavnom provodi na pužnim prešama, a zbog velike količine ulja i radi postizanja boljeg iskorištenja ponekad je potrebno naknadno prešanje pogače. Tijekom prešanja se uslijed trenja zagrijava i preša i materijal, stoga se pri proizvodnji hladno prešanih ulja mogu koristiti pužne preše s hlađenjem. Nakon prešanja ulje se filtrira i pakira u boce od tamnog stakla u struji dušika ili nekog drugog inertnog plina zbog toga što je laneno ulje jako osjetljivo na oksidaciju. Izostanak postupka kondicioniranja direktno utječe na nisko iskorištenje postupka hladnog prešanja, no zbog specifičnog sastava s izuzetno visokim udjelom višestruko nezasićenih masnih kiselina, zahtijeva poseban postupak proizvodnje jer bi svako izlaganje povišenoj temperaturi loše djelovalo na održivost ulja. Laneno ulje sadrži velik udio  $\alpha$ -linolenske kiseline (18:3) koja čini više od 50 % ukupnog sastava masnih kiselina, a oksidira 20-40 puta brže od oleinske (18:1) i 2-4 puta brže od linolne (18:2). Nutritivna vrijednost ističe se po sastavu omega-3 masnih kiselina, prisutnosti plastokromanola 8, gama tokoferola i  $\beta$ -sitosterola. Usporedba sastava lana i glavnih uljarica prikazana je u Tablici 1. Aktualno je vjerovanje potrošača da su manje prerađene namirnice i zdravije te da se postupkom rafinacije uklanjaju korisni sastojci ulja. Uslijed svega toga, posljednjih godina raste interes potrošača za hladno prešana ulja koja zadržavaju svoj prirodan sastav zbog blagog proizvodnog procesa, kao i karakterističan okus i miris na izvornu sirovinu od koje su nastali. Njihovo tržište, iako još uvijek malo i neznatno u usporedbi s tržištem djevičanskog maslinovog ulja ili rafiniranih ulja, u stalnom je porastu (Krimer Malešević, 2017).

Tablica 1. Kemijski sastav ulja iz lana i glavnih uljarica (Przybylski, 2005)

<i>Komponente</i>	<b>LAN</b>	<b>LINOLA</b>	<b>ULJANA REPICA</b>	<b>SOJA</b>	<b>SUNCOKRET</b>
<b>masne kiseline (%)</b>					
C 16:0	5.3	6.1	3.8	11.2	6.0
C 18:0	3.3	3.8	1.7	4.1	4.0
C 18:1	17.9	15.5	58.2	24.3	16.5
C 18:2	14.7	71.3	20.1	54.6	72.4
C 18:3	58.7	2.0	9.6	8.3	0.5
zasićene masne kiseline	9.0	10.0	6.2	15.6	11.2
mononezasićene masne kiseline	18.1	17.1	64.2	23.4	16.7
polinezasićene masne kiseline	72.9	72.9	29.6	61.0	72.1
<b>tokoferoli (ppm)</b>					
alfa	20	15	272	116	613
gama	200	200	423	737	19
delta	7	5	-	275	-
plastokromanol-8	120	110	75	-	-
ukupno	347	330	770	1128	632
<b>fitosteroli (%)</b>					
brasikasterol	1	1	14	-	-
kampesterol	27	23	28	18	7
stigmasterol	8	4	1	15	7
beta-sitosterol	50	45	52	54	58
delta-7-avenasterol	10	18	5	2	4
<b>ukupni steroli (g/kg)</b>	2.3	2.2	6.9	2.6	3.1



## 2.1.2. Pogača lana

Pogača lana je kruti ostatak dobiven kao nusprodukt nakon prešanja lanenih sjemenki prilikom proizvodnje lanenog ulja. Koristi se kao stočna hrana, ima velik potencijal i u prehrani ljudi, a može služiti i za izolaciju lignana, proteina i polisaharida kojima je bogata. Lanena pogača sadrži mješavinu polisaharida koja se sastoji od ksiloze, glukoze, galaktoze, arabinoze, ramnoze, fukoze i galakturonske. Raznovrsnost polisaharida pobudila je interese farmaceutske industrije zbog vlakana topivih u vodi i prehrambene industrije gdje polisaharidi lanene pogače nalaze primjenu kao aditivi za zgušnjavanje i emulzije. Razlog tome su slična emulgirajuća svojstva gumi arabici (E414) te se mogu usporediti s guara gumom (E412) u kapacitetu vezanja vode. Unatoč činjenici da spada u 8 uljanih pogača koje dominiraju svjetskim tržištem s udjelom proteina od 32%, uljana pogača lana ima ograničenu nutritivnu uporabu kao stočna hrana zbog nedostatka lizina, prisustva antipiridoksin faktora (antivitamina B6), cijanogenog glikozida linamarina i slabe probavljivosti. Zbog toga se njena primjena okreće npr. ekstrakciji flavonola herbacetin diglukozida koji pokazuje biološku aktivnost u vidu poboljšanja bubrežne funkcionalnosti, liječenja otkazivanja bubrega, poboljšanja formiranja kostiju i antiviralnih aktivnosti protiv gripe (Krimer Malešević, 2017). Posljednje desetljeće naročito je posvećena pažnja primjeni uljanih pogača kao sirovina u bioprocima i srodnim industrijama zahvaljujući njihovoj visokonutritivnoj vrijednosti, stalnoj dostupnosti i kompetitivnoj cijeni. Očekuje se da će se do 2021. godine godišnja proizvodnja uljanih pogača povećati za 23%, što iznosi  $315 \times 10^6$  tona. Zbog nedavne naftne krize u Turskoj je ispitan potencijal proizvodnje biodizela iz sjemena lana i drugih uljarica (npr. soja, kikiriki, suncokret, uljana repica) uslijed čega se može očekivati još veća proizvodnja njihovih pogača (Krimer Malešević, 2017). Cijela biljka lana pa tako i pogača lana bi se mogla koristiti kao obnovljivi izvor tekstilnih vlakana, jestivog ulja i antioksidanasa. Na taj način bi se uspješno zamijenili sintetski aditivi koji se koriste u hrani i kozmetici (Pag, 2014).

Prema kemijskom sastavu lanena pogača sadrži 11-14% vode, 30-34% proteina, 6-9% masti, 31-35% ekstrahiranih tvari bez dušika i 9-10% celuloze. Od biološki važnih aminokiselina sadrži 22,5% arginina, 8,7% lizina, 3,1% cistina i 5,4% triptofana od ukupnog aminokiselinskog udjela u pogači. Nedavna izvješća pokazala su različita funkcionalna svojstva (antioksidacijska, antitumorska i antiupalna) (Goyal i sur., 2014) i zdravstvene prednosti proteinskih izolata lana (pozitivan učinak na kardiovaskularno zdravlje, dijabetes, gljivične infekcije i neurodegenerativne bolesti). Proteini lana obiluju argininom i glutaminom (Oomah i Giuseppe Mazza, 1993), koji su vrlo važni za prevenciju i liječenje srčanih bolesti i

održavanje imunološkog sustava (Goyal i sur., 2014). Imaju veće svojstvo vezanja vode u usporedbi s drugim komercijalnim biljnim proteinima (npr. sojinim), a dodatkom u proizvod povećavaju viskoznost, bolje vezanje vode, čvrstoću, trajnost i vezanje masti. Jedan od načina iskorištenja pogače lana je pretvorba u konvencionalno isplativu hranu u obliku koncentrata proteina. Na taj način moguće je dobiti proizvod s visokim sadržajem proteina i poželjnih funkcionalnih karakteristika. Moguća je primjena u proizvodnji tjestenine, mesnih preradevina, žitarica za doručak, sladoleda, raznih umaka itd. Lan u posljednje vrijeme dobiva na važnosti u svjetskom prehrambenom lancu kao funkcionalna hrana koja pokazuje povoljno djelovanje na jednu ili više funkcija organizma te zahvaljujući hranjivim svojstvima utječe na poboljšanje općeg stanja organizma i zdravlja ili znatno utječe na smanjenje rizika od nastanka bolesti. Matumoto-Pintroa i suradnici (2011) dodali su komercijalno dostupne lignane (SDG ekstrakt) u mliječne napitke obogaćene lanenim ulje kako bi povećali oksidativnu stabilnost. Iz pogače lana dobiva se laneno brašno koje se može koristiti kao koncentrirana stočna hrana u krmnim smjesama. Ovo brašno sadrži oko 35 % proteina, od kojeg je 85 % probavljivo. Laneno brašno ima sposobnost da djeluje blago i regulativno na probavni sustav. Stočarima je poznata ta karakteristika pa ga rado uključuju u obroke u malim količinama (Šimetić, 2009). Istraživanje o senzorskim karakteristikama i nutritivnoj vrijednosti pekarskih proizvoda pripremljenih od lanenog brašna (receptura s do 30% lanenog brašna) kao zamjene pšeničnog brašna pokazalo je vrlo pozitivne rezultate. Takvi pekarski proizvodi predstavljaju nutritivnu i funkcionalnu vrijednost u vidu dijetalnih vlakana i linolne kiseline. Dodatak lanenog brašna je učinkovita strategija povećanog unosa vlakana i omega-3 masnih kiselina u ljudskoj prehrani. Dosadašnja istraživanja pokazala su veliki interes u prehrambenoj industriji za iskorištavanje vrijednih spojeva iz lanene pogače gdje su posebnu pažnju preuzeli proteini, topljiva vlakna i ekstrakti polifenola.

## **2.2. Fenolni spojevi**

Lan sadrži velike količine fenolnih komponenti koje su poznate po njihovim antikancerogenim i antioksidativnim svojstvima. U osnovi, lan ima tri različita tipa fenolnih komponenti: fenolne kiseline, flavonoide i lignane. Studije su pokazale visok udjel fenolnih spojeva (56-62%) u izolatima proteina koji su povezani s njihovom antioksidativnom aktivnošću. Supernatant koji je preostao nakon taloženja proteinskog izolata pokazao je relativno velik udio fenola u slobodnom obliku, u rasponu od 87 do 95% (Alu'datt, 2016). U ulje dobiveno iz lana ekstrahira se većina masnih kiselina, a samo manji udio fenolnih

spojeva upravo zbog hidrofilnosti fenola. Njihovo prisustvo u ulju povećava oksidacijsku stabilnost i pridonosi boljem nutritivnom profilu (Herchi i sur., 2011).

Lan se smatra najbogatijim biljnim izvorom lignana prema visokom sadržaju sekoizolarikirezinol diglukozida (SDG). Nadalje, lan ima velike količine fenolnih kiselina, 800 – 1000 mg po 100 g sjemena, a esterificirane fenolne kiseline mogu se naći u količini 300 – 500 mg po 100 g sjemena (Shahidi i Naczk, 2004). *Trans*-ferulinska i *trans*-cimetna kiselina navedene su kao glavne fenolne kiseline, dok su *trans*-kavska, *p*-kumarinska, klorogenska, galna i druge kiseline manjinske komponente nađene u oljuštenom i odmašćenom sjemenu lana. Lan također može sadržavati druge fenolne kiseline kao *p*-kumarinsku u glukoliziranoj formi te fenolpropanoide kao što su sinapinska, vanilinska i gentisinska kiselina. Neke fenolne komponente koje se još mogu nalaziti u lanu su derivati hidroksicimetne kiseline, *p*-kumarinska kiselina-4-beta-glukozidaza, ferulinska kiselina-4-beta-glukozidaza i flavonoid herbacetin diglukozid (Herchi i sur., 2014).

Zadnjih 10 godina, istraživanja su usmjerena ka povećanoj pozornosti polifenola koji se mogu naći u obilju u našoj prehrani i njihovoj mogućoj ulozi u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao što su rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti.

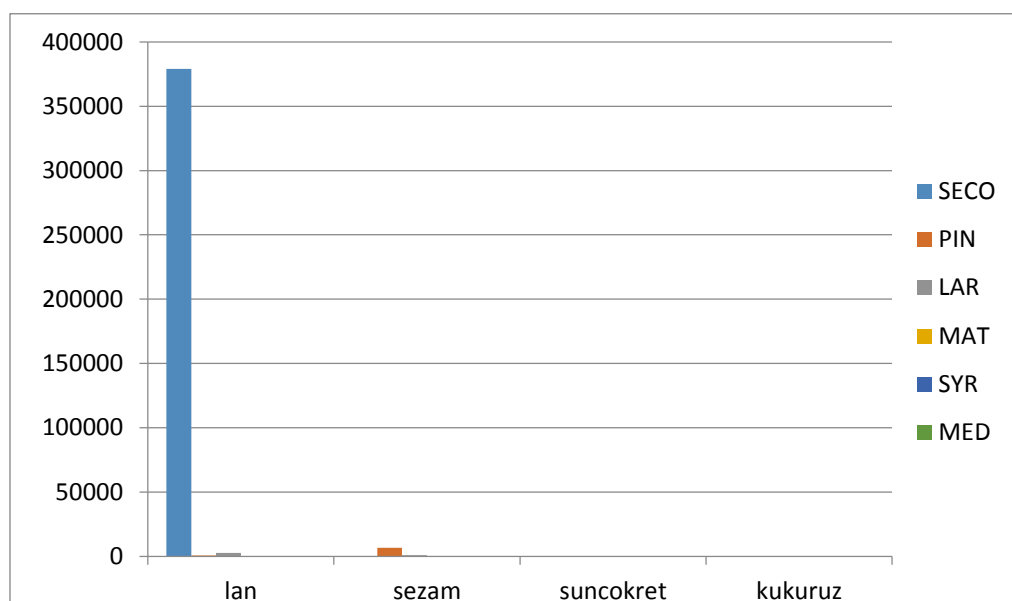
### **2.2.1. Lignani**

Laneno sjeme, pa tako i lanena pogača je najveći izvor lignana iz grupe fenolnih spojeva s vrijednostima 75 – 800 puta većim nego u drugim uljaricama, žitaricama, leguminozama, voću ili povrću (Przybylski, 2005). Na grafu (Slika 2) prikazan je sadržaj lignana u lanu, sezamu, suncokretu i kukuruzu. Njihova prisutnost povezana je s vlaknima te im je udjel veći u cjelovitim namirnicama. U lanenom sjemenu najzastupljeniji je sekoizolarikirezinol (SECO), najčešće u obliku sekoizolarikirezinol – diglukozid (SDG) s 29421 mg kg<sup>-1</sup> (Slika 3). SDG ima dvije vezane glukoze, a kada se te glukoze uklone hidrolizom dobiva se SECO. To su spojevi sa dibenzilbutanskim kosturom te kod sisavaca djeluju kao hormoni – fitoestrogeni, za koje se vjeruje da smanjuju rizik kod nekoliko tipova raka i kardiovaskularnih bolesti. SDG se pojavljuje u 2 izomerna oblika u lanu. Osim SDG, manje količine ostalih tipova lignana identificirane u lanenom sjemenu su matairezol (MAT), izolalicirezol (ISO), larikirezol (LAR) i pinorezinol (PIN). Nastaju putem biosintetskih reakcija od propil-benzenskih struktura do PIN te dalje, redukcijom, oksidacijom, dehidrogenacijom i adicijom do ostalih molekula lignana. SDG se sintetizira u vanjskim slojevima sjemena, pretežito u ljusci, gdje se trenutno inkorporira u oligomerne strukture i stvaraju se lignan makromolekule. SDG se u sjemenu

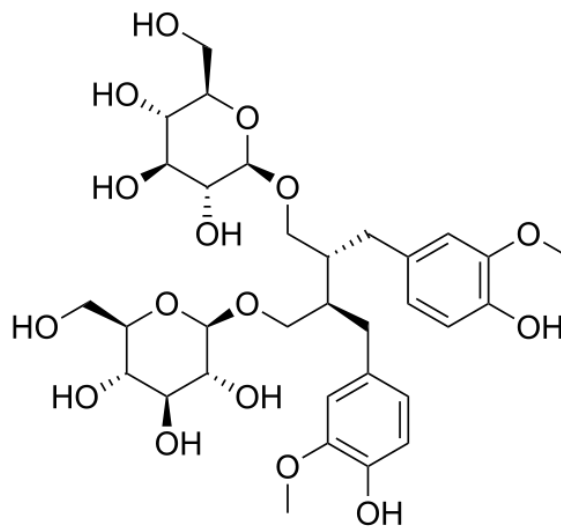
lana gotovo i ne nalazi u slobodnom obliku (Obranović, 2015). Osim SDG koji zauzima oko 62,0 % lignan makromolekule, ostale dijelove čine: herbacetin diglukozid (5,7 %), diglukozid ferulinska kiselina (9,0 %) i glukozaid *p*-kumarinska kiselina (12,2 %) (Struijs i sur., 2009). Sadržaj lignana u lanu se razlikuje u ovisnosti o sortama, o mjestu uzgoja i klimatskim uvjetima uzgoja (Johnsson, 2004).

Najvažniji lignan u pogači lana, SDG, varira u koncentracijama od 6 do 18 mg g<sup>-1</sup> suhe mase. Konvencionalne metode ekstrakcije SDG-a uključuju mljevenje kao predtretman, ekstrakciju polimera lignana s etanolom, metanolom ili acetonom i alkalnu hidrolizu, pri čemu se oslobađa SDG cijepanjem esterskih veza u oligomeru SDG-3-hidroksi-3-metilglutanske kiseline. U posljednje vrijeme, porastao je interes za ekološki prihvatljive, selektivne i učinkovite metode ekstrakcije lignana iz lanenog sjemenja. Među tim tehnikama su mikrovalovi, enzimi (beta-glukuronidaza/sulfataza ili celulaza), električki potpomognuta ekstrakcija visokim naponima i pulsirajućim električnim poljima, koje su pokazale svoju učinkovitost za ekstrakciju SDG-a iz lanenog sjemenja.

Zdravstvene prednosti lignana iz lana leže u njegovom antioksidativnom kapacitetu. Antioksidativni kapacitet SDG-a povezan je smanjivanjem oksidacijskih uvjeta zbog toga što SDG diglikozid i njegovi aglikoni djeluju kao protektori te sprječavaju uništavanje DNA i liposoma te putem crijevne mikroflore u ljudi prelaze u enterodiol (ED) i enterolakton (EL) koji imaju pozitivno djelovanje u obrani organizma od raka dojki, debelog crijeva i prostate (Landete, 2012).



Slika 2. Sadržaj lignana u lanu, sezamu, suncokretu i kukuruzu (Landete, 2012)



Slika 3. Struktura sekoizolarikirezinol diglucosida (SDG) (Anonymus 2, 2017)

## 2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su polifenolni spojevi malih molekulskih masa koji se nalaze u hrani biljnog porijekla. Sastoje se od fenolne jezgre i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljikovih atoma. Derivati se razlikuju u obrascima hidroksilacije i metoksilacije aromatičnih prstena.

Prisutne slobodne fenolne kiseline nađene u sjemenu lana su: *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, *o*- i *p*-kumarinska i sinapinska (Kasote i sur., 2013). Terpinc i suradnici (2012) navode da su u uljanoj pogači lana od fenolnih kiselina prisutne: protokatehinska, galna, vanilinska, gentisinska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, *o*- i *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska, kavaska i klorogenska kiselina.

Najrasprostranjenije hidroksicimetine kiseline su: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina (Razzaghi-Asl i sur., 2013). Najpoznatiji konjugat hidroksicimernih kiselina je klorogenska kiselina - ester kafeinske i hininske kiseline. Galna kiselina je trihidroksilni derivat koji sudjeluje u stvaranju hidrolizujućih tanina. Dimerni kondenzirani produkt galne kiseline (heksahidroksidifenska kiselina) i dilakton, elaginska kiselina (nastao kondenzacijom galne kiseline) su česti metaboliti biljaka. Elaginska kiselina ulazi u sastav elagitanina gdje je prisutna kao ester analoga difenske kiseline s glukozom.

Kod hidroksicimernih kiselina, dihidroksicinamati (kafeinska i klorogenska kiselina) su aktivniji hvatači slobodnih radikala od nekih monohidroksicinamata (*m*-, *o*-kumarinska kiselina), ali i manje efikasni od ostalih monohidroksicinamata (*p*-kumarinske, ferulinske i

izoferulinske kiseline). To se dešava zahvaljujući utjecaju pozicije hidroksilnih i metoksilnih grupa. Prisustvo druge hidroksilne grupe u *orto*- položaju (kafeinska kiselina) povećava antioksidantnu aktivnost zahvaljujući dodatnoj stabilizaciji putem formiranja *o*-kinona. Hidroksilne grupe u *p*-položaju (4-OH) na hidroksicimetnim kiselinama (*p*-kumarinska kiselina) značajno povećavaju antiradikalni kapacitet u usporedbi s ekvivalentnim *o*- i *m*-položajima (*o*- ili *m*-kumarinska kiselina) (Krimer Malešević, 2017).

Fenolne kiseline privlače pozornost kao sastojci hrane s antioksidativnom aktivnošću i kao prirodni konzervansi. Antioksidansi sprječavaju užeglost hrane, nutritivne gubitke, nastanak nepoželjnih organoleptičkih svojstava i gubitak boje. Pored produženja roka trajanja prehrambenih proizvoda, sprječavaju nastanak mnogih bolesti izazvanih stresom. Dijetalni antioksidansi imaju važnu ulogu i kao nutraceutici zahvaljujući zaštitnoj ulozi organizma od slobodnih radikala koji mogu biti proizvod normalnog metabolizma ili poticati iz vanjskih izvora. S obzirom na to da na fenolne kiseline otpada 30% od ukupnih polifenola unijetih putem prehrane, one imaju važnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja.

Osim u smjesama, fenolne kiseline imaju primjenu i kao zasebne supstance. Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antikancerogenu, antimikrobnu i neuroprotektivnu (Razzaghi-Asl i sur., 2013). Ferulinska kiselina je u Japanu dozvoljena kao prehrambeni aditiv. U SAD-u i većini europskih zemalja brojni prirodni ekstrakti s visokim sadržajem ferulinske kiseline dodaju se hrani kao smjese antioksidanasa odobrene od strane FDA (Ou i Kwok, 2004). Kumar i Pruthi, (2014) u svom istraživačkom radu prikazali su različite industrijske i biološke primjene ferulinske kiseline, među kojima je i održavanje boje zelenog graška, zelenog čaja, sprečavanje oksidacije i tamnjenja banana, sprečavanje bakterijske kontaminacije i dr. Slično važi i za ostale fenolne kiseline čija mogućnost primjene raste iz godine u godinu.

### **2.2.3. Utjecaj na zdravlje**

Provedena su brojna istraživanja na temu utjecaja lignana i fenolnih kiselina na zdravlje te možemo zaključiti da se fenolne komponente ističu po njihovim antikancerogenim i antioksidativnim svojstvima. Lignani imaju povoljan učinak na kardiovaskularne bolesti, simptome menopauze, rak dojke, rak prostate, rak crijeva te imaju hepatoprotektivno djelovanje (Landete, 2012). Hsu i Yen (2008) dokazali su da *p*-kumarinska i galna kiselina djeluju protiv pretilosti i predložili njihovu novu primjenu u vidu zdravstvenih suplemenata. Pokazalo se da *p*-kumarinska kiselina smanjuje rizik od raka želuca smanjenjem stvaranja

kancerogenih nitrozamina i sudjeluje u obrani od biljnih patogena, a *p*-hidroksibenzojeva kiselina i njeni derivati primjenjuju se kao dijetalni antioksidansi, prirodne arome i konzervansi. Poznato je da kavaska kiselina selektivno blokira biosintezu leukotriena koji sudjeluje u autoimunim bolestima kao što su astma i alergijske reakcije (Krimer Malešević, 2017). Nadalje, dijetalna vlakna, lignani i  $\omega$ -3 masne kiseline prisutne u sjemenu lana imaju preventivni učinak na rizik od dijabetesa (Goyal i sur., 2014). Dokazano je da lignan iz lana, SDG, inhibira ekspresiju gena za fosfoenolpiruvat karboksilazu koji kodira za ključni enzim odgovoran za sintezu glukoze u jetri (Prasad, 2002). Dodatak prehrani od 10 g praška lanenog sjemena, tijekom mjesec dana, kod dijabetesa tipa 2, smanjuju glukozu u krvi za 19,7% i glikirani hemoglobin za 15,6% (Goyal i sur., 2014). Nekoliko je studija predstavilo prednost uporabe lanene pogače čiji rezultat je bio smanjenje kolesterola u krvi (Kajla i sur., 2014). Kao lijek se koristi sjeme, ulje, lanena pogača i lanena sluz - protiv kašlja, grčeva u želucu, žučnih kamenaca, hemeroida, čireva, opekline i probadanja. Žlica lanenog sjemena dnevno sprečava infarkt srca. Čaj od lanenog sjemena koristi se kao sredstvo za grgljanje kod upala u ustima, ždrijelu, desnima, te protiv promuklosti, kod upala želučane sluznice (sluz potpuno prekriva iritiranu i nadraženu sluznicu). Oblozi od lanene kaše ublažavaju bolove i omekšavaju potkožne čireve. Lan pomaže zdravlju srca i krvožilnog sustava te smanjuje razinu lošeg kolesterola, rizik od nastanka raka dojke i jajnika. Naime, lignani koje sadrže sjemenke lana i ulje, umanjuju aktivnost estrogena, glavnog spolnog hormona žene, pomažu zdravlju debelog crijeva, imaju antikancerogena svojstva te smanjuju mogućnost pojave zatvora (Šimetić, 2009).

## **2.3. Metode ekstrakcije**

### **2.3.1. Ekstrakcija organskim otapalima**

Ekstrakcija je postupak kojim je moguće izolirati fenolne tvari iz pogače lana, nakon čega je potrebna identifikacija istih. Postupak ekstrakcije predstavlja kritični korak pri izolaciji biološki aktivnih spojeva, a da bi se postigao maksimalni ekstrakcijski učinak, potrebno je uzeti u obzir prirodu biljnog materijala, ali i prirodu samih spojeva. Lipofilnost ili hidrofilnost spojeva ima značajan utjecaj na njihovu topljivost u otapalu i obratno, polarnost otapala također utječe na efikasnost ekstrakcije (Tsao i Deng, 2004).

Tradicionalno se postupci ekstrakcije temelje na ekstrakciji tekuće/tekuće. Međutim, takva ekstrakcija podrazumijeva upotrebu velikih količina organskih otapala, dugotrajna je i ekološki neprihvatljiva (Aturki i sur., 2008). Najčešće korišteno otapalo u ekstrakciji kruto/tekuće je heksan te u znatno manjoj mjeri metanol. Izbor metode za ekstrakciju fenolnih komponenti ovisi o njihovoj molekularnoj strukturi. Manje polarni fenolni spojevi mogu se ekstrahirati heksanom, ali nasuprot tome, SECO, koji posjeduje veću polarnost, ekstrahira se polarnim otapalima kao što su vodeni metanol ili etanol (Herchi i sur., 2014). Fenoli lana mogu se ekstrahirati organskim otapalima pomiješanim s vodom (Herchi i sur., 2014). Osim metanola i heksana za ekstrakciju mogu se koristiti vodena otopina etanola i vodena otopina metanola s amonijakom (Oomah i sur., 1996). Prisutnost amonijaka u vodenoj otopini metanola zaslužna je za uklanjanje cijanogenih glikozida, fenolnih kiselina, tanina i topljivih šećera iz lanene pogače. U jednom istraživanju provedena je ekstrakcija pogače lana s acetonom, metanolom i vodom, metoda koja se obično koristi za izolaciju spojeva velikog antioksidacijskog kapaciteta iz sjemena lana. Svako od tih otapala ima drugačiju polarnost i različitu topljivost spojeva. Selektivna ekstrakcija komponenata može utjecati na učinkovitost antioksidacijskog aktiviteta sjemena lana (Barthet i sur., 2014). Izrazito polarne fenolne kiseline nije moguće ekstrahirati čistim organskim otapalima pa se preporučuje korištenje smjese alkohol-voda ili aceton-voda (Acosta-Estrada i sur., 2014). U nekim su istraživanjima korištena razna organska otapala praćena hidroliznim tretmanom radi promicanja oslobađanja fenolnih spojeva. Za analizu SDG, alkalna hidroliza s natrijevim hidroksidom opisana je kao djelotvorna metoda (Herchi i sur., 2014). U novije vrijeme jedno od najčešće upotrebljivanih otapala za ekstrakciju biljnih lignana je otopina 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. Zadnjih nekoliko godina stručnjaci rade na pronalaženju optimalnog rješenja kada je ekstrakcija u pitanju s ciljem smanjenja vremena ekstrakcije i smanjenja volumena korištenog otapala uz istovremeno zadržavanje poželjne kemijske strukture i biološke aktivnosti određenog fenolnog spoja (Fontana i sur., 2013).

### **2.3.2. Nove metode ekstrakcije**

Nove metode ekstrakcije u ovom slučaju podrazumijevaju ekstrakcije potpomognute energijom mikrovalova i kombinacije mikrovalova i ultrazvuka. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija je jedna od najvažnijih metoda za ekstrakciju vrijednih spojeva iz biljnih materijala (Spingo i Faveri, 2009). Mikrovalnom ekstrakcijom postiže se smanjenje vremena trajanja ekstrakcije, smanjena uporaba otapala i poboljšani ekstrakcijski prinos.

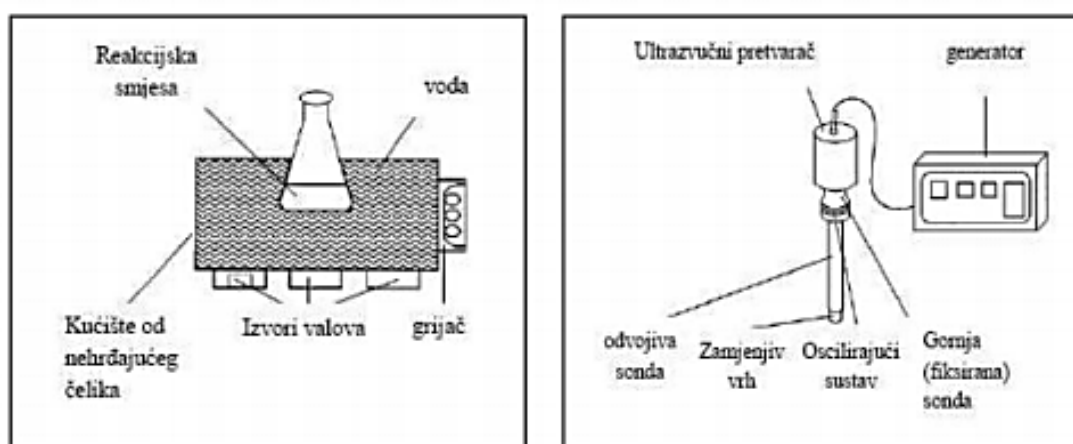


Upotreba dielektričnog zagrijavanja u laboratorijima pomoću mikrovalova započela je kasnih 70-tih u primjenom prehrambenoj industriji. Mikrovalno zračenje predstavlja elektromagnetsko zračenje s frekvencijom od 300 MHz do 300 GHz. Snaga mikrovalova je neionizirajuća tj. energija fotona nije dovoljno velika da dođe do pucanja kemijskih veza u molekulama. Prilikom mikrovalnog zračenja voda, masti i šećeri apsorbiraju zračenje koje se konvertira u gibanje, a gibanje prelazi u toplinu. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi simultano zagrijavaju cijeli volumen uzorka i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava interakciju otapala i matriksa uzorka te tako potiče otapanje analita i pospješuje ekstrakciju (Nemes, 2007). Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju, a to su ekstrakcija u zatvorenim sustavima pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te u otvorenim sustavima pri atmosferskom tlaku. Moderni uređaji za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju imaju vrlo dobru kontrolu tlaka i temperature čime je poboljšana preciznost i ponovljivost ekstrakcijske metode. Izbor otapala u mikrovalnoj ekstrakciji je vrlo važan, a ovisi o topljivosti željenog analita, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom da upijaju mikrovalove. U pravilu, izabrano otapalo treba imati veliku dielektričnu konstantu. Temperatura je također važan faktor za mikrovalnu potpomognutu ekstrakciju, općenito, povišenjem temperature ekstrakcija je učinkovitija. Međutim, pri ekstrakciji termički nestabilnih spojeva visoke temperature mogu uzrokovati razgradnju analita. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija smanjuje vrijeme postupka ekstrakcije i količinu potrebnog otapala. Primjenom mikrovalnog zračenja može se izbjeći razgradnja uzorka zbog visoke temperature, a energija mikrovalova olakšava desorpciju analita iz matrice (Lopez-Avila, 2000). Nedostaci ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su ponekad zahtjevno razdvajanje ekstrakta od uzorka dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem i hlađenje ćelije za ekstrakciju na sobnu temperaturu (Jagić, 2016).

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom visokog intenziteta (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu (Caili i sur., 2006), jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Chemat i sur., 2004a). Ekstrakcija ovisi o primijenjenoj frekvenciji, intenzitetu ultrazvuka, vremenu tretiranja i polarnosti medija, koji može biti čista otopina ili smjesa otapala. Najčešće se koristi zvučna proba i ultrazvučna kupelj u koju se uroni uzorak s odgovarajućim otapalom. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je učinkovitija od klasične ekstrakcije u tikvici uz mućkanje ili ekstrakcije po Soxhletu jer je mnogo bolji kontakt između čvrste tvari i otapala. Ultrazvučne kupelji (Slika 4) se često koriste u laboratorijima jer su dostupne i

relativno su jeftine. Prednosti postupka ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su njena relativna brzina, jednostavnost, smanjenje čestica analita, ubrzani prijenos mase tvari i relativno povoljni instrumenti, a nedostaci uporaba velikog volumena otapala i često se koristi postupak višekratne ekstrakcije. Ekstrakti se nakon završene ekstrakcije moraju filtrirati (Jagić, 2016). Ultrazvučna ekstrakcija je vrlo učinkovita pri odvajanju analita iz različitih vrsta realnih uzoraka (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Ultrazvuk se može koristiti i u kombinaciji s mikrovalnim zračenjem s ciljem povećavanja stupnja iskorištenja (Chemat i sur., 2004b).



Slika 4. Shematski prikaz uređaja za ultrazvučnu ekstrakciju: a) ultrazvučna kupelj, b) ultrazvučna sonda (Lopez-Avila, 2000)

## 2.4. HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) jedna je od najčešćih metoda za identifikaciju, kvantifikaciju i pročišćavanje smjese spojeva. Komponente smjese raspodijele se između adsorbensa (stacionarne faze) i otapala (mobilne faze) koje se giba kroz kolonu noseći komponente smjese. Stacionarnu fazu čine vrlo male čestice ( $<10\ \mu\text{m}$ ) u čeličnoj koloni te se u procesu koriste tlakovi od nekoliko milijuna Pa. HPLC kao metodu karakteriziraju mnoge prednosti kao što su brza i precizna kvantitativna analiza, visoka osjetljivost, automatizacija procesa, različita količina uzorka (preparativne tehnike od  $\mu\text{g}$  do kg uzorka) te je podložna različitim uzorcima (može obraditi  $>60\%$  poznatih spojeva, dok GC oko  $15\%$ , mogu se analizirati uzorci s malo ili minimalno pripreme). HPLC se upotrebljava u različitim područjima istraživanja npr. za analizu složenih spojeva, čišćenje kemijskih spojeva,

razvoj procesa za sintezu kemijskih spojeva, izoliranje prirodnih spojeva ali isto tako može se koristiti za analizu onečišćenja zraka, za praćenje materijala koji mogu ugroziti sigurnost na radu ili zdravlje, za praćenje razine pesticida u okolišu, kontrolu hrane i lijekova, forenzička ispitivanja i sl. Uređaji koje sadrži HPLC su spremnici mobilne faze, pumpe, sustavi za unošenje uzorka, predkolone i kolone, detektori i uređaji za snimanje i integriranje (računalo). Kao rezultat odziva detektora koji ovisi o koncentraciji sastojaka u uzorku, a bilježi se kao funkcija vremena (ili volumena dodane mobilne faze) dobiva se kromatogram koji prikazuje niz simetričnih elucijskih krivulja odnosno pikova. Položaj pika na vremenskoj osi (retencijsko vrijeme) pomaže u identifikaciji sastojaka, a iz površine ispod pika izračunava se količina svakog odijeljenog sastojka. Za kvalitativnu analizu, koja se bazira na očitanoj vremenu zadržavanja komponenti smjese, potreban nam je standardni uzorak poznatog sastava čijom usporedbom možemo utvrditi prisutnost ili odsutnost nekog sastojaka. Kvantitativne analize koje se temelje na površini pika, mogu koristiti baždarenje primjenom standarda pomoću elektroničkih integratora u modernim uređajima. Pripravi se niz standardnih otopina koje su po sastavu slične ispitivanom uzorku, zatim se standardnim otopinama snime kromatogrami, a visine pikova ili njihove površine prikažu u ovisnosti o koncentraciji. Dobiveni baždarni pravac predstavlja temelj za kvantitativnu analizu ispitivanih uzoraka (Djaković, 2015).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Uzorak

U ovom radu je korištena lanena pogača koja je proizvedena hladnim prešanjem u laboratoriju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta iz sjemenki lana uzgojenih 2016. godine u okolici Zagreba na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dobivena pogača, odnosno nusproizvod nakon proizvodnje ulja samljeven je i skladišten u hladnjaku na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.2. Reagensi i standardi

U radu su se za istraživanje koristili:

- metanol;
- HPLC metanol;
- natrij hidroksid;
- redestilirana voda
- mravlja kiselina;
- *o*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD);
- sekoizolarikirezinol diglukozid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD);

#### 3.1.3. Aparatura

Pri izradi eksperimentalnog djela ovog rada korištene su planska tresilica (B. Braun Biotech International, Melsungen, Njemačka), centrifuga (Falcon, Colorado, SAD) i Agilent Technologies HPLC 1200 Series sustav s binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom (Santa Clara, SAD).

### 3.1.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva pogače na tresilici

Ekstrakcija na planskoj tresilici u trajanju od 5 sati (150 okretaja/min) s dva različita otapala (70 % MetOH + 30 % 0,1 M NaOH i 70 % MetOH + 30 % 1 M NaOH) je provedena kao dio većeg pokusa izolacije fenolnih spojeva iz pogače lana putem novih tehnologija i ekološki prihvatljivih otapala. Cilj je bio utvrditi da li se isti spojevi ekstrahiraju ovim putem kao i upotrebom novih metoda. Za pokus je odvagano 1, 2, 3, i 5 g suhe lanene pogače u Erlenmayer tikvice uz dodatak 100 ml otapala. Dobiveni ekstrakt centrifugiran je 5 minuta na 5000 okretaja nakon čega je supernatant prebačen u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopunjen otapalom do oznake. Sadržaj iz odmjerne tikvice se pomoću šprice profiltrira u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ . Pripremljene vijalice služe za određivanje lignana na HPLC sustavu.

### 3.1.5. Određivanje sastava fenolnih spojeva putem HPLC-a

Sastav fenolnih spojeva određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koristeći Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz komine masline provedeno je na Phenomenax C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm  $\times$  4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å). Kao mobilna faza korištene su 0,1 % otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1 % otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Kolona kojom je razdvajanje provedeno korištena je prvi put. Kolona je kraća za razliku od uobičajenih kolona koje se instaliraju na HPLC-u, te su čestice stacionarne faze nešto sitnije nego kod standardnih kolona. To omogućava bolje razdvajanje spojeva u kraćem vremenu. Dodatna stijenka oko jezgre (engl. "Core Shell") ima funkciju smanjenja tlaka.

*Protok otapala:* 0,900 ml min<sup>-1</sup>

*Temperatura kolone:* 30°C

*Količina injektiranog uzorka:* 5  $\mu\text{L}$

*Gradijent:* programiran (Tablica 2)

A: 0,1% mravlja kiselina u vodi

B: 0,1% mravlja kiselina u metanolu

Tablica 2. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

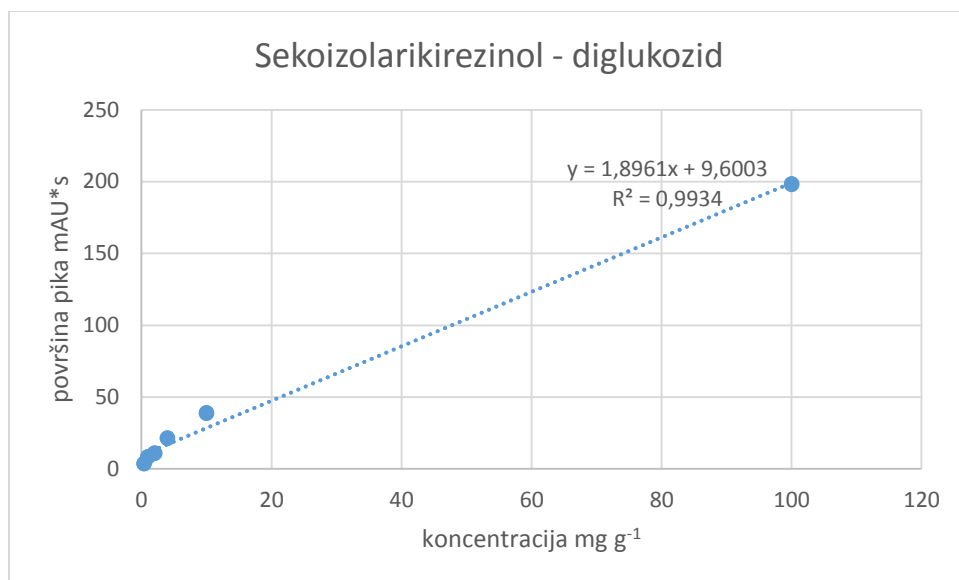
Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su na 280 i 330 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom području (od 200 do 400 nm). Za kvantifikaciju fenolnih spojeva korištene su baždarne krivulje izrađene injektiranjem otopina ranije navedenih standarda u koncentracijama od 0 do 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.2. Rezultati i rasprava

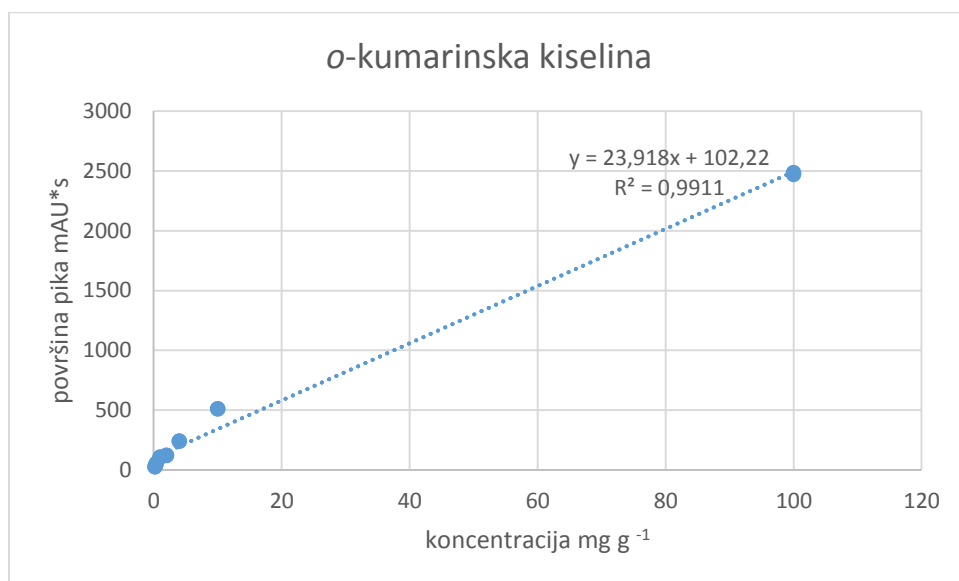
Pogača lana odabrana je kao predmet istraživanja ovog rada zbog vrlo visokog udjela lignana i fenolnih kiselina što je čini dobrom sirovinom za njihovu ekstrakciju. U ovom radu istraživane su različite kombinacije otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva i njihova detekcija putem HPLC-a.

Lignani i fenolne kiseline u pogači lana identificirani su usporedbom s retencijskim vremenima injektiranih standarda, a kvantificirani prema jednadžbama izrađenim iz baždarnih krivulja (Tablica 3). Za izračunavanje retencijskog vremena i jednadžbe pravca koristili smo standarde za sekoizolarikirezinol diglukozid i *o*-kumarinsku kiselinu.

Priprema baždarnih krivulja standarda SDG i o-kumarinske kiseline:



Slika 5. Baždarni dijagram sekoizolarikirezinola-diglukozida (SDG)



Slika 6. Baždarni dijagram o-kumarinske kiseline

Tablica 3. Vremena zadržavanja standarda (retencijska vremena) i jednadžbe pravaca

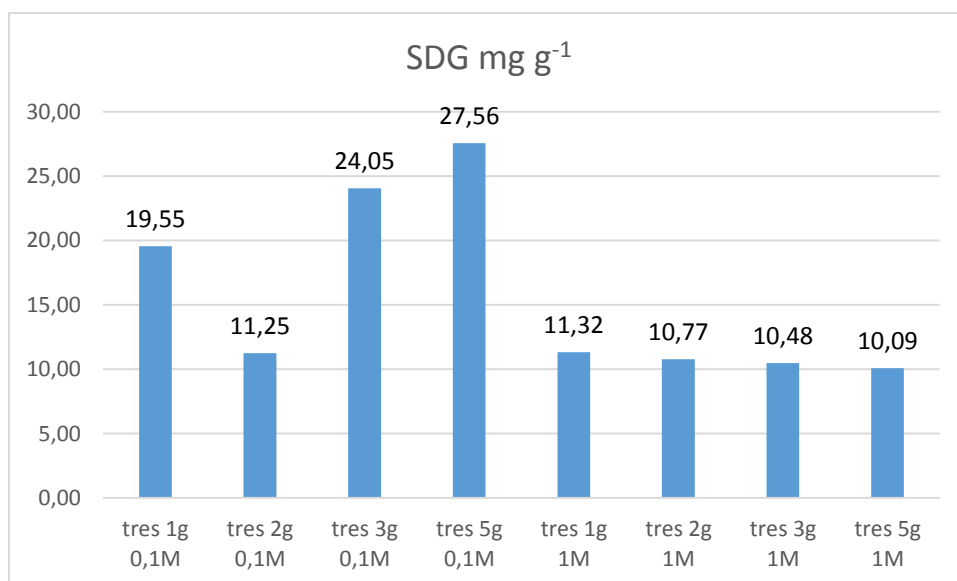
<b>Standard</b>	<b>Vrijeme zadržavanja (min)</b>	<b>Jednadžba pravca</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Sekoizolarikirezinol diglukozid	13,81	$y=1,8961x+9,6003$	0,9943
<i>o</i> -kumarinska kiselina	15,77	$y=23,918x+102,22$	0,9911

Lan je najbogatiji prirodni izvor lignana te sadrži 75-800 puta više lignana nego druge biljke, no zbog njegove hidrofilnosti vrlo mali dio prelazi u ulje. Obranović (2015) u svom istraživanju iznosi kako se samo 0,001% od ukupnih lignana iz sjemena nalazi u ulju, stoga velika većina zaostaje u samoj lanenoj pogači.

Za ekstrakciju fenolnih spojeva na planskoj tresilici korišteni su uzorci lanene pogače od 1, 2, 3 i 5 grama, 0,1 M NaOH i 1 M NaOH, te su dobivene koncentracije SDG-a, glukozid *p*-kumarinska i glukozid ferulinska kiselina (mg g<sup>-1</sup>) iz baždarnih dijagrama pomoću koncentracija standarda određenih na HPLC-u (Slika 5 i Slika 6).

Ekstrakcija na planskoj tresilici u trajanju od 5 sati (150 okretaja/min) provodila se s dva različita otapala: 70 % MetOH + 30 % 0,1 M NaOH i 70 % MetOH + 30 % 1 M NaOH. NaOH se dodaje s ciljem postizanja bazne hidrolize kako bi došlo do pucanja esterskih veza unutar makromolekula.





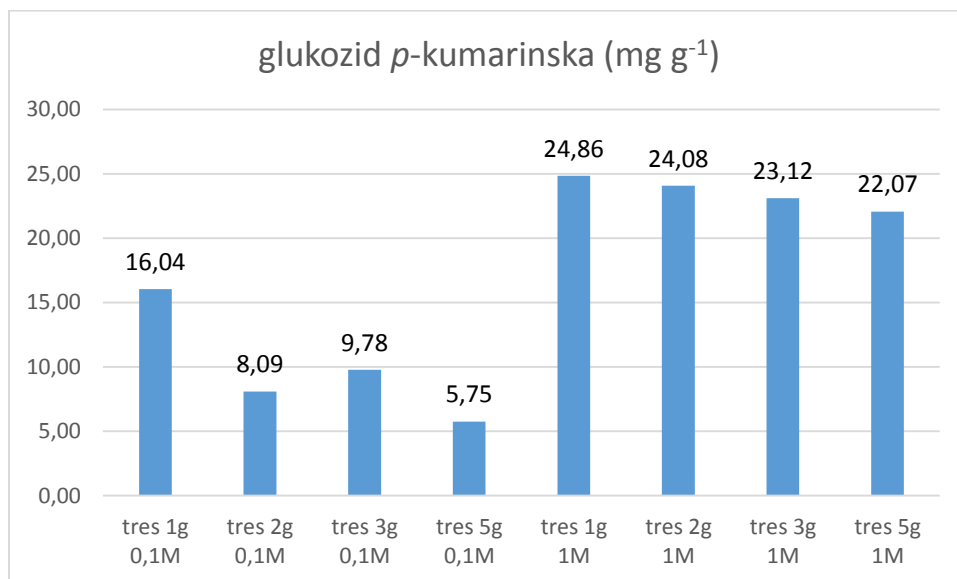
Slika 7. Koncentracija SDG-a ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u odnosu na masu uzorka (g) i koncentraciju NaOH (M)

Na grafu (Slika 7) vidi se kako je najviše SDG-a ( $27,56 \text{ mg g}^{-1}$ ) ekstrahirano u uzorku lanene pogače čija masa iznosi 5 grama  $0,1 \text{ M}$  NaOH. Općenito je manja koncentracija SDG-a dobivena u uzorcima s  $1 \text{ M}$  NaOH.

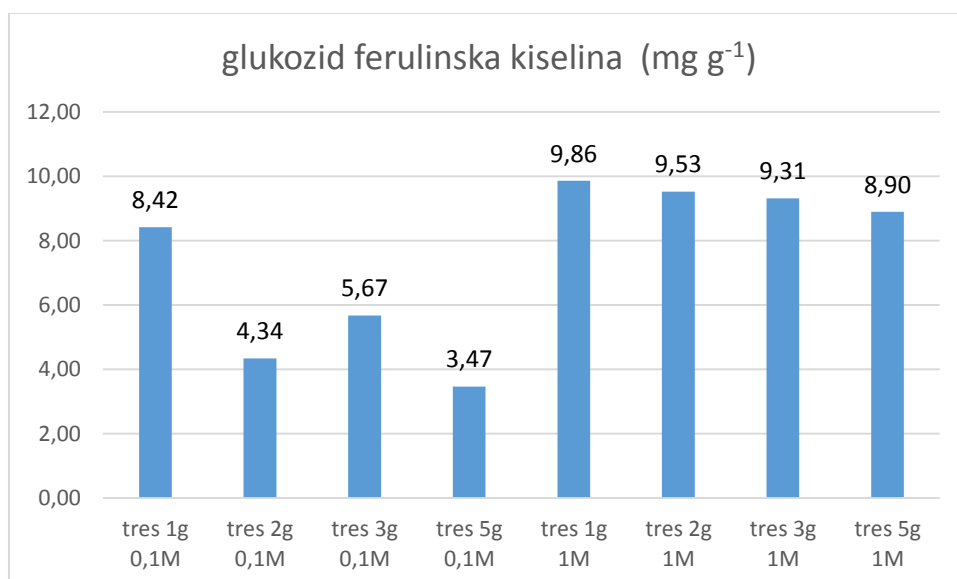
U lanenom sjemenu najzastupljeniji je sekoizolarikirezinol (SECO), najčešće u obliku sekoizolarikirezinol diglukozid (SDG) s  $29,421 \text{ mg g}^{-1}$ . U pogači lana, SDG varira u koncentracijama od 6 do  $18 \text{ mg g}^{-1}$  suhe mase. Beejmohun i suradnici (2007) su u svom istraživačkom radu koristeći ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i mikrovalovima određivali koncentracije SDG-a, glukoziđa *p*-kumarinske kiseline i glukoziđa ferulinske kiseline. Koncentracija SDG-a koju su dobili Beejmohun i suradnici (2007) je iznosila  $15,6 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$ . U drugim literaturnim navodima koncentracija SDG-a se kretala oko  $13 \text{ mg g}^{-1}$  (Liggins i sur., 2000). Sadržaj lignana u lanu se razlikuje u ovisnosti o sortama, o mjestu uzgoja i klimatskim uvjetima uzgoja (Johnsson, 2004).

Osim SDG koji zauzima oko 62,0 % lignan makromolekule, glukoziđ ferulinska kiselina čini 9,0 % i glukoziđ *p*-kumarinska 12,2 % (Struijs i sur., 2009). Yuan i suradnici (2008) navode kako je neophodno koristiti NaOH prilikom ekstrakcije SDG-a kako bi došlo do pućanja esterskih veza u makromolekulama. U svom radu navode da koncentracija NaOH i temperatura imaju znaćajan utjecaj na vrijeme potrebno da dođe do hidrolize i oslobađanja SDG-a iz makromolekule. Osim bazne hidrolize prilikom ekstrakcije lignana iz lana je

potrebno koristiti i kiselinsku hidrolizu kojom se iz SDG dobiva SECO te male količine *p*-kumarinske i ferulinske kiseline.



Slika 8. Koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline (mg g<sup>-1</sup>) u odnosu na masu uzorka (g) i koncentraciju NaOH (M)



Slika 9. Koncentracija glukozida ferulinske kiseline (mg g<sup>-1</sup>) u odnosu na masu uzorka (g) i koncentraciju NaOH (M)

Na grafovima (Slika 8 i Slika 9) gdje su prikazane koncentracije glukozida *p*-kumarinske i glukozida ferulinske kiseline dobiveni su slični rezultati s obzirom na korištene uzorke. Najveća koncentracija fenolnih kiselina prisutna je u uzorku mase 1 g i koncentracije 1 M

NaOH. Povećanjem mase uzorka koncentracije 1 M NaOH, količina ekstrahiranih fenolnih spojeva je u laganom padu. U uzorcima koncentracije 0,1 M NaOH najbolji ekstrakcijski učinak postignut je kod mase od 1 grama.

Iako se ove fenolne kiseline ekstrahiraju u istim omjerima s obzirom na masu uzorka i molarnu koncentraciju NaOH, dobivena je veća koncentracija glukozida *p*-kumarinske (24,86 mg g<sup>-1</sup> u uzorku mase 1 g, koncentracije 1 M NaOH) nego glukozida ferulinske kiseline (9,86 mg g<sup>-1</sup> u uzorku mase 1 g, koncentracije 1 M NaOH).

Beejmohun i suradnici (2007) su u svom radu objavili koncentracije *p*-kumarinske kiseline od  $2,8 \pm 0,1$  mg g<sup>-1</sup>, a koncentracije ferulinske kiseline iznosila je  $3,7 \pm 0,1$  mg g<sup>-1</sup>. Nadalje, Ramsay i suradnici (2016) dobili su koncentracije glukozid kumarinske kiseline u rasponu 0,03-3,18 mg g<sup>-1</sup> i glukozid ferulinske kiseline 0,02-1,13 mg g<sup>-1</sup>. Čapin (2016) je u svom istraživačkom radu koristeći referentnu metodu s otapalom koje se sačinjavalo od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH dobio *p*-kumarinsku kiselinu u koncentraciji od 0,57 mg g<sup>-1</sup> i ferulinsku kiselinu u koncentraciji od 0,34 mg g<sup>-1</sup>. Kraushofer i Sontag (2002) ukazuju na to da je način ekstrakcije fenolnih kiselina iz lana jako bitan faktor. Prema njihovim istraživanjima najbolja metoda ekstrakcije je „two step“ metoda gdje je prvi korak alkalna hidroliza, a drugi enzimatska hidroliza. Prilikom ovakvog načina ekstrakcije koncentracija *p*-kumarinske kiseline je iznosila oko 1,5 mg g<sup>-1</sup>, a ferulinske oko 1,0 mg g<sup>-1</sup>.

Otopina od 0,25 do 1 M NaOH je potpuno ionska (Na<sup>+</sup> + OH<sup>-</sup>) te snažna interakcija iona s mikrovalovima doprinosi ekstrakciji fenolnih spojeva (Nemes, 2007). Stoga se može pretpostaviti da se učinak povećava kombinacijom mikrovalova i otopinom NaOH određene molarnosti te u konačnici pokazuje bolje rezultate.

## 4. ZAKLJUČAK

- Metodom ekstrakcije lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana pomoću planske tresilice uspješno su detektirani sljedeći spojevi: sekoizolarikirezinol diglukozid, glukozid *p*-kumarinske i glukozid ferulinske kiseline. Unatoč rezultatima iz drugih istraživanja pri ovim ekstrakcijama nije detektirana *o*-kumarinska kiselina.
- Najveća koncentracija sekoizolarikirezinol diglukozida (SDG) ekstrahirana je s otapalom manje molarnosti NaOH (70 % MetOH + 30 % 0,1 M NaOH) u uzorku lanene pogače čija masa iznosi 5 grama.
- Za ekstrahiranje većih koncentracija fenolnih kiselina kao učinkovitije otapalo pokazalo se ono veće molarnosti NaOH (70 % MetOH + 30 % 1 M NaOH) u uzorku lanene pogače mase 1 gram.

## 5. POPIS LITERATURE

Acosta-Estrada B. A., Gutiérrez-Urbe J. A., Serna-Saldívar S. O. (2014) Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* **152**: 46-55.

Alu'datt M., Rababah T., Alhamad M., Gammoh S., Ereifej K., Kubow S., Alli I. (2016) Characterization and antioxidant activities of phenolic interactions identified in byproducts of soybean and flaxseed protein isolation. *Food Hydrocolloids* **61**:119-127.

Anonymus 1 Wikipedia (2017) Lan. <<https://en.wikipedia.org/wiki/Flax>> Pristupljeno 25. svibnja 2017.

Anonymus 2 Wikipedia (2017) Secoisolariciresinol diglucoside. <[https://en.wikipedia.org/wiki/Secoisolariciresinol\\_diglucoside](https://en.wikipedia.org/wiki/Secoisolariciresinol_diglucoside)> Pristupljeno 25. svibnja 2017.

Aturki A., Fanali S., D'Orazio G., Rocco A., Rosati C. (2008) Analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil by using reversed-phase capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **29**: 1643–1650.

Barthet V., Klensporf-Pawlik D., Przybylski R. (2014) Antioxidant activity of flaxseed meal components. *Canadian Journal of Plant Science* **94**(3): 593-602.

Beejmohun V., Fliniaux O., Grand E., Lamblin F., Bensaddek L., Christen P., Kovensky J., Fliniaux M.A., Mesnard F. (2007) Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochemical Analysis* **18**: 275–282.

Caili F., Haijun T., Quanhong L., Tongyi C., Wenjuan D. (2006). Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrasonics Sonochemistry* **13**: 511–516.

Chemat S., Lagha A., Amar H.A., Bartels P., Chemat F. (2004a) Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal* **19**: 188-195.

Chemat S., Lagha A., Amar H.A., Chemat F. (2004b) Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrasonics Sonochemistry* **11**: 5-8.

Ćapin M. (2016) Izolacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda proizvodnje lanenog ulja. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Djaković S. (2015) HPLC. Nastavni materijal. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Zagreb: Prehrambeno biotehnološki fakultet.

Fontana R. A., Antonioli A., Bottini R. (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 8987-9003.

Goyal A., Sharma V., Upadhyay N., Gill S., Sihag M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology* **51**(9): 1633-1653.

Herchi W., Arraez-Roman D., Trabelsi H., Bouali I., Boukhchina S., Kallel H., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2014) Phenolic Compounds in Flaxseed: a Review of Their Properties and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Journal of Oleo Science* **63**(1): 7-14.

Herchi W., Sakouhi F., Boukhchina S., Kallel H., Pepe C. (2011) Changes in Fatty Acids, Tocochromanols, Carotenoids and Chlorophylls Content During Flaxseed Development. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**: 1011-1017.

Hsu C.-L., Yen G.-C. (2008) Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**: 53 – 61.

Jagić K. (2016) Primjena ekstrakcijskih metoda za jestiva ulja. Završni rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Johnsson P. (2004) Phenolic compounds in flaxseed. PhD Thesis. University of agricultural sciences Uppsala.

Kajla P., Sharma A., Sood D. (2014) Flaxseed – a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology* **52**(4): 1857-1871.

Kasote D., Badhe Y., Hegde M. (2013) Effect of mechanical press oil extraction processing on quality of linseed oil. *Industrial Crops and Products* **42**: 10-13.

- Kraushofer T., Sontag G. (2002) Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology* **215**: 529–533.
- Krimer Malešević V. (2017) Fenolni potencijal uljanih pogača. Doktorska disertacija. Novi Sad: Tehnološki fakultet.
- Kumar N., Pruthi V. (2014) Potential applications of ferulic acid from natural sources. Review. *Biotechnology Reports* **4**: 86–93.
- Landete J. M. (2012) Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International* **46**: 410-424.
- Liggins J., Grimwood R., Bingham S. A. (2000) Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Analytical Biochemistry* **287**, 102–109.
- Lopez-Avila V. (2000) Microwave-Assisted Extraction. *Academic Press* str. 1389
- Matumoto-Pintroa P.T., Petita H.V., Giroux H.J., Cortes C., Agnona N.G., Britten M. (2011) Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Dairy Research* **78** (1) : 111–117.
- Naczki M., Shahidi F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food – Review. *Journal of Chromatography A* **1054**: 95–111.
- Nemes S.M. (2007) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) from Flaxseed. PhD Thesis. University of McGill
- Nemes S.M., Orsat V. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside Method Development. *Food and Bioprocess Technology* **4**: 1219–1227.
- Obranović M. (2015) Karakterizacija lanenog ulja inozemnih sorata uljnog lana uzgojenih na području republike Hrvatske. Doktorski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Oomah B.D., Giuseppe Mazza G. (1993) Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry* **48**: 109–114.
- Oomah B.D., Giuseppe Mazza G., Przybylski R. (1996) Comparison of Flaxseed Meal Lipids Extracted with Different Solvents. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **29**: 654–658.

- Ou S., Kwok K.-C. (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 1261–1269.
- Pag A.I., Radu D.G., Draganescu D., Popa M.I., Sirghie C. (2014) Flaxseed cake – a sustainable source of antioxidant and antibacterial extracts. *Cellulose Chemistry and Technology* **48**: 265-273.
- Prasad K. (2002). Suppression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by secoisolariciresinol diglucoside (SDG), a new antidiabetic agent. *International Journal of Angiology* **11**: 107–109.
- Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **41** (NN 41/2012)
- Przybylski R. (2005) Flax Oil and High Linolenic Oils. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6. izd., (Shahidi F.,ured.), John Wiley & Sons, Inc., str. 281-301.
- Ramsay A., Fliniaux O., Quéro A., Molinie R., Demailly H., Hano C., Paetz C., Roscher A., Eric Grand E., Kovensky J., Schneider B., Mesnard F. (2016) Kinetics of the incorporation of the main phenolic compounds into the lignan macromolecule during flaxseed development. *Food Chemistry* **217**: 1-8.
- Razzaghi-Asl N., Garrido J., Khazraei H., Borges F., Firuzi O. (2013) Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry* **20**: 4436-4450.
- Sharav O., Shim Y. Y., Okinyo-Owiti D., Sammynaiken R., Reaney J. T. (2013) Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 88-96.
- Spingo G., Faveri D.M. (2009) Microwave – assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *Journal of Food Engineering* **93**: 210–217.
- Struijs K., Vincken J., Doeswijk T., Voragen A., Gruppen H. (2009) The chain length of lignan macromolecule from flaxseed hulls is determined by the incorporation of coumaric acid glucosides and ferulic acid glucosides. *Phytochemistry* **70**: 262-269.
- Šimetić S. (2008) Lan u proizvodnji i upotrebi. *Sjemenarstvo* **25**: 217-221.
- Terpinc P., Čeh B., Ulrih N.P., Abramovič H. (2012) Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products* **39**: 210-217.



Tsao R., Deng Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography* **812**: 85-99.

## Izjava o izvornosti

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

Elma Mikalaj

ime i prezime studenta