

# Identifikacija i kvantifikacija biološki aktivnih spojeva odabranog mediteranskog bilja

---

Pfeifer, Danijela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:676981>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Danijela Pfeifer

1196/N

**IDENTIFIKACIJA I  
KVANTIFIKACIJA BIOLOŠKI  
AKTIVNIH SPOJEVA  
ODABRANOG MEDITERANSKOG  
BILJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc dr. sc. Sandre Pedisić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Patricije Lisice, mag. ing. techn. aliment.

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

*Ovim putem želim zahvaliti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Sandri Pedisić, na ukazanom povjerenju, vodstvu, suradnji te korisnim savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem i Patriciji Lisici na pomoći u provođenju istraživačkog dijela rada te savjetima za obradu rezultata. Bez tebe bi izrada ovog diplomskog rada bila neostvariva. Dodatno se želim zahvaliti i svim zaposlenicima Laboratorija za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva, koji su mi omogućili sve potrebne uvjete za izradu diplomskog rada.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Gajdoš Kljusurić, prof. dr. sc. Štaliću i svim ostalim profesorima na svim vještinama i znanjima, koje sam uz vašu pomoć usvojila.*

*Zahvaljujem svojim prijateljicama K.&L. bez kojih bi putovanje do fakulteta i studiranje bilo nezamislivo. Hvala svim kolegama, a posebice Josipu i Ivi. Uz vas je moje vrijeme provedeno na fakultetu bilo znatno ljepše, ispunjenije, a i puno uspješnije. Posebno hvala i mom K.P., uz tebe je sve lakše.*

*Naposlijetku bih se najviše htjela zahvaliti svojim roditeljima, tati Mladenu i mami Mirjani, kao i bratu Antunu i sestri Marini. Omogućili ste da moje studiranje bude bezbrižnije i da mi ništa ne nedostaje. Hvala vam na neizmjernejoj ljubavi, podršci te vjeri u moj uspjeh.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA ODABRANOG MEDITERANSKOG BILJA

*Danijela Pfeifer, 1196/N*

**Sažetak:** *Kadulja, lovor, mirta, pasji trn, rogač, timijan i tršlja su začinske i ljekovite biljke Mediteranskog područja koje imaju brojne potencijalne primjene zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva. Njihovi biljni ekstrakti koriste se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te medicini. Kako bi dobiveni ekstrakti sadržavali što viši sadržaj bioaktivnih spojeva ključno je odabrati optimalnu metodu ekstrakcije. Cilj ovog rada bio je izolirati, identificirati i kvantificirati biološki aktivne spojeve navedenih biljaka izolirane uzastopnom ekstrakcijom s tri različita otapala (heksan, 80 %-tni aceton i 96 %-tni etanol) u ultrazvučnoj kupelji. Identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih spojeva provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV-VIS/DAD detektorom i s dvojnou spektrometrijom masa. Dodatno je utvrđena antioksidacijska aktivnost dobivenih biljnih ekstrakata primjenom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Maseni udio karotenoida i klorofila u ekstraktima promatranih biljaka određeni su u rasponu od 25,12 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> u bobicama pasjeg trna do 97,60 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> u lišću tršlje te je 96 %-tni etanol bio najučinkovitije otapalo za ekstrakciju karotenoida i klorofila. S druge strane, otapalo s najvećom učinkovitošću za ekstrakciju polifenolnih spojeva bilo je 80 %-tni aceton te su maseni udjeli polifenolnih spojeva iznosili od 230,06 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> u mahunama rogača do 5356,29 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> u lišću tršlje. U usporedbi s udjelom karotenoida i klorofila, antioksidacijska aktivnost bila je u većoj mjeri u korelaciji s udjelom ukupnih polifenolnih spojeva. Najviše vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uočene su u frakcijama s 80 %-tnim acetonom.*

**Ključne riječi:** *bioaktivni spojevi, fenolni spojevi, pigmenti, mediteransko bilje, ultrazvučna ekstrakcija*

**Rad sadrži:** 75 stranica, 28 slika, 5 tablica, 183 literaturna navoda, 4 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Doc. dr. sc. Sandra Pedisić*

**Pomoć pri izradi:** *Patricija Lisica, mag. ing. techn. aliment.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Zoran Zorić*
2. Doc.dr.sc. *Sandra Pedisić*
3. Doc.dr.sc. *Maja Repajić*
4. Prof.dr.sc. *Sandra Balbino* (zamjena)

**Datum obrane:** 24. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF SELECTED MEDITERRANEAN PLANTS

*Danijela Pfeifer, 1196/N*

**Abstract:** Sage, laurel, myrtle, sea-buckthorn, carob, thyme and mastic tree are spices and herbs from the Mediterranean area with many potential applications due to the high content of biologically active compounds. Their plant extracts are used in the food and pharmaceutical industry, as well as in medicine. In order to obtain plant extracts with the highest possible content of bioactive compounds, it is crucial to choose the optimal extraction method. The aim of this study was to isolate, identify and quantify biologically active compounds of the studied plant extracts obtained by successive extraction with three different solvents (hexane, 80% acetone and 96% ethanol) in an ultrasonic bath. Identification and quantification of bioactive compounds were performed by high-performance liquid chromatography with UV-VIS/DAD detector and tandem mass spectrometry. Additionally, the antioxidant capacity of the plant extracts was determined using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical. The mass fractions of carotenoids and chlorophylls in the extracts of analyzed plants were determined in the range of 25.12 mg 100 g dw<sup>-1</sup> in sea-buckthorn berries up to 97.60 mg 100 g dw<sup>-1</sup> in mastic tree leaves, while 96% ethanol was the most efficient solvent for the extraction of carotenoids and chlorophylls. On the other hand, the solvent with the highest efficiency for the extraction of polyphenolic compounds was 80% acetone and the mass fractions of polyphenolic compounds were ranging from 230.06 mg 100 g dw<sup>-1</sup> in carob pods up to 5356.29 mg 100 g dw<sup>-1</sup> in mastic tree leaves. In comparison with the content of carotenoids and chlorophylls, antioxidant activity was more in correlation with the content of total polyphenolic compounds. The highest antioxidant activity values were observed in the fractions with 80% acetone.

**Keywords:** bioactive compounds, phenolic compounds, pigments, mediterranean plants, ultrasound-assisted extraction

**Thesis contains:** 75 pages, 28 figures, 5 tables, 183 references, 4 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD, Sandra Pedisić, Assistant Professor

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

#### Reviewers:

1. PhD. Zoran Zorić, Assistant professor
2. PhD. Sandra Pedisić, Assistant professor
3. PhD. Maja Repajić, Assistant professor
4. PhD. Sandra Balbino, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 24 September 2021



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. KLASIFIKACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA .....	2
2.2. MEDITERANSKO BILJE .....	4
2.2.1. Kadulja (lat. <i>Salvia officinalis</i> L.) .....	4
2.2.2. Timijan (lat. <i>Thymus vulgaris</i> L.) .....	5
2.2.3. Lovor (lat. <i>Laurus nobilis</i> L.) .....	5
2.2.4. Tršlja (lat. <i>Pistacia lentiscus</i> L.) .....	6
2.2.5. Mirta (lat. <i>Myrtus communis</i> L.) .....	7
2.2.6. Pasji trn (lat. <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) .....	8
2.2.7. Rogač (lat. <i>Ceratonia siliqua</i> L.) .....	8
2.3. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM ULTRAZVUKA .....	9
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA LJEKOVITOG I AROMATSKOG BILJA .....	11
2.5. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA BILJNIH EKSTRAKATA .....	12
2.5.1. Tekućinska kromatografija .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. UZORCI LJEKOVITOG I AROMATSKOG BILJA .....	18
3.2. ODREĐIVANJE UKUPNE SUHE TVARI .....	18
3.2.1. Aparatura .....	18
3.2.2. Pribor .....	18
3.2.3. Postupak određivanja suhe tvari .....	18
3.3. UZASTOPNA UAE .....	19
3.3.1. Kemikalije .....	19
3.3.2. Aparatura .....	19
3.3.3. Pribor .....	19
3.3.4. Postupak UAE .....	20
3.4. ODREĐIVANJE PIGMENATA PRIMJENOM HPLC-UV-VIS/DAD METODE .....	21
3.4.1. Kemikalije .....	21
3.4.2. Aparatura .....	22
3.4.3. Kromatografska analiza .....	22
3.4.4. Identifikacija i kvantifikacija karotenoida i klorofila .....	23
3.5. ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA PRIMJENOM UPLC-MS/MS METODE .....	23
3.5.1. Kemikalije .....	23
3.5.2. Aparatura .....	24
3.5.3. Postupak određivanja .....	24
3.5.4. Kvantifikacija fenolnih spojeva .....	28
3.6. ODEĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM .....	29
3.6.1. Kemikalije .....	29
3.6.2. Aparatura .....	30

3.6.3.	Pribor .....	30
3.6.4.	Postupak određivanja .....	30
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>32</b>
4.1.	BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LJEKOVITIH I AROMATSKIH BILJAKA .....	33
4.1.1.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća kadulje .....	33
4.1.2.	Fenolni spojevi u ekstraktima lišća kadulje .....	34
4.1.3.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća timijana .....	36
4.1.4.	Fenolni spojevi u ekstraktima lišća timijana .....	37
4.1.5.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća lovora .....	38
4.1.6.	Fenolni spojevi u ekstraktima lišća lovora .....	39
4.1.7.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća tršlje.....	40
4.1.8.	Fenolni spojevi u ekstraktima lišća tršlje .....	41
4.1.9.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća mirte .....	43
4.1.10.	Fenolni spojevi u ekstraktima lišća mirte .....	44
4.1.11.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima bobica mirte .....	45
4.1.12.	Fenolni spojevi u ekstraktima bobica mirte .....	45
4.1.13.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima bobica pasjeg trna .....	46
4.1.14.	Fenolni spojevi u ekstraktima bobica pasjeg trna .....	47
4.1.15.	Karotenoidi i klorofili u ekstraktima mahuna rogača .....	48
4.1.16.	Fenolni spojevi u ekstraktima mahuna rogača .....	49
4.2.	USPOREDBA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA MEDITERANSKOG BILJA.....	50
4.2.1.	Sadržaj karotenoida i klorofila .....	50
4.2.2.	Sadržaj polifenolnih spojeva .....	52
4.2.3.	Antioksidacijska aktivnost .....	53
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>76</b>

# 1. UVOD

Začinsko, aromatično i ljekovito bilje, zahvaljujući visokom sadržaju biološki aktivnih spojeva, proučavano je za upotrebu u brojne svrhe, poput korištenja u kulinarstvu te upotrebe njihovih ekstrakata i eteričnih ulja u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i u medicini.

Kadulja, lovor, mirta, pasji trn, rogač, timijan i tršlja nativne su biljke Mediteranskog područja, koje imaju potencijalno blagotvorno djelovanje na zdravlje zbog sadržaja biološki aktivnih spojeva, pretežno različitih polifenola. Ekstrakti navedenih biljaka proučavani su zbog antioksidativnog djelovanja, no pokazali su i brojne druge učinke poput antimikrobnog, protuupalnog, antimutagenog i antikancerogenog djelovanja. Pokazuju i antidijabetički, hepatoprotektivni te neuroprotektivni učinak. Za sve navedeno, zaslužni su upravo biološki aktivni spojevi za koje je, zbog razlike u strukturi i polarnosti, ključno odabrati odgovarajuću metodu ekstrakcije.

Uz široku upotrebu konvencionalnih ekstrakcija s organskim otapalima, s napretkom tehnologije razvile su se suvremene metode koje su sve zastupljenije. Jedna od njih je i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, koja osigurava kraće vrijeme ekstrakcije, manji volumen otapala i nižu temperaturu ekstrakcije, što posljedično dovodi do veće kvalitete dobivenog ekstrakta. Dodatno, uzastopnom ekstrakcijom korištenjem otapala rastuće polarnosti dobivaju se frakcije koje sadrže različite vrste biološki aktivnih spojeva različite polarnosti. Nakon ekstrakcije potrebno je identificirati i kvantificirati izolirane biološki aktivne spojeve. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV-VIS/DAD detektorom i tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti s dvojnou spektrometrijom masa predstavljaju naj snažnije analitičke metode za identifikaciju i kvantifikaciju biološki aktivnih spojeva iz biljnih ekstrakata.

Cilj ovog istraživanja bio je identificirati i kvantificirati karotenoide, klorofile i polifenolne spojeve prisutne u ekstraktima odabranog mediteranskog bilja dobivenih uzastopnom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom s tri različita otapala – heksanom, 80 %-tnim acetonom i 96 %-tnim etanolom. Dodatno, cilj je bio istražiti utjecaj sadržaja navedenih spojeva na antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KLASIFIKACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

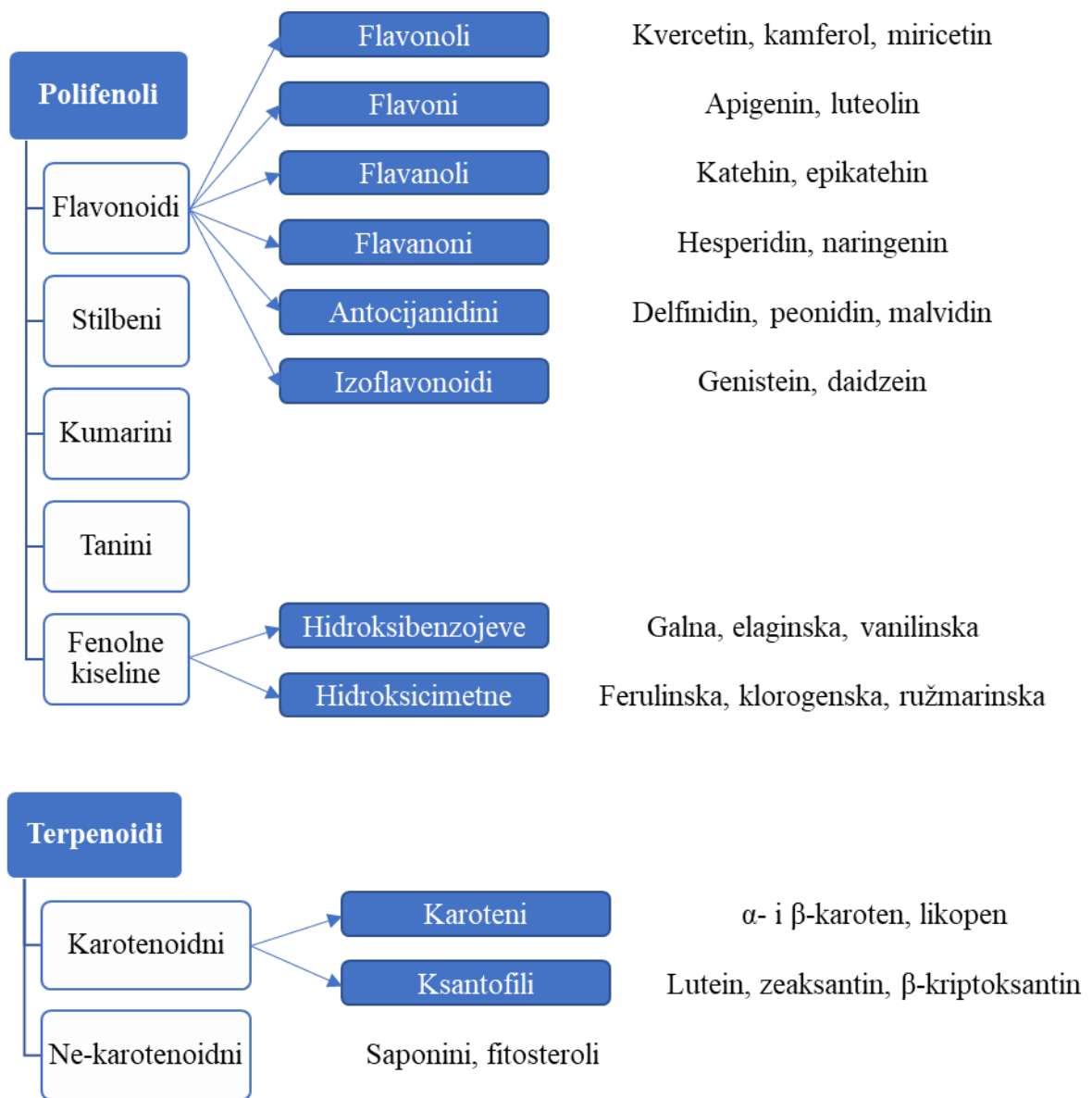
Definicija biološki aktivnih spojeva mijenjala se kroz povijest, posebice uzrokovana napretkom u polju znanstvenih istraživanja. Na sastanku znanstvenika u Stuttgartu dogovorena je definicija da su biološki aktivni spojevi esencijalni i neesencijalni spojevi koji se nalaze u prirodi, dio su hranidbenog lanca, te mogu imati učinak na ljudsko zdravlje (Biesalski i sur., 2009). Abdelkarim i sur. (2014) ustanovili su da je biološki aktivan spoj onaj koji ima sposobnost da djeluje na jednu ili više dijelova ljudskog tkiva ispoljavajući širok raspon mogućih učinaka, koji može na ljudski organizam djelovati pozitivno ili negativno. Izvor biološki aktivnih spojeva mogu biti biljke, životinje ili drugi organizmi.

S druge strane, fitokemikalije odnose se isključivo na biološki aktivne, nehranjive spojeve biljaka (Wiseman, 2013). Mogu se svrstati u 3 glavne grupe – polifenoli, terpenoidi i tioli (Thomas i sur., 2015). Grupa polifenola i terpenoida dijeli se na dodatne podgrupe koje su prikazane na slici 1 (Saini i sur., 2015; Thomas i sur., 2015; Liu, 2004). U posljednjoj grupi fitokemikalija, tiola, nalaze se glukozinolati, alilni sulfidi i indoli. Postoje i druge fitokemikalije koje se ne nalaze u prethodno navedene 3 velike grupe, a to su primjerice klorofili i betaini (Thomas i sur., 2015).

Još od epidemiološke longitudinalne studije 7 zemalja, koja je uključivala i Hrvatsku, provedene pod vodstvom Ancela Keysa (Keys, 1997) raste osviještenost o blagodatima mediteranske prehrane. Povezana je sa značajnim poboljšanjem sveukupnog zdravstvenog statusa, a posebno se ističe preventivan učinak na razvoj velikog broja kroničnih nezaraznih bolesti (Lăcătușu i sur., 2019; Sofi i sur., 2008). Uz cjelovite žitarice, voće i povrće, leguminoze, orašaste plodove i maslinovo ulje kao temeljne namirnice ove prehrane, ističe se i korištenje začinskog bilja karakterističnog za mediteranske zemlje (Oldways, 2021).

Začinsko i ljekovito bilje upravo zbog svog sadržaja fitokemikalija ispoljava blagotvorne učinke na ljudski organizam (Godlewska-Żyłkiewicz i sur., 2020). Fitokemikalije, posebice polifenoli, pokazali su preventivno djelovanje na razvoj kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, kao i šećerne bolesti (Marrelli i sur., 2020; Salehi i sur., 2020). Chojnacka i sur. (2020) proučavali su ekstrakte polifenola u svrhu mogućeg korištenja pri liječenju bolesti uzrokovane SARS-CoV-19 virusom zbog njihovog antiviralnog djelovanja, odnosno mogućeg djelovanja na inhibiciju virusnih enzima neophodnih za umnažanje koronavirusa. Dodatno, ističe se blagotvoran učinak na imunološki sustav, kako polifenolnih spojeva, tako i karotenoida i ostalih biljnih pigmenta (klorofil, antocijani) (Alkhatib, 2020).

Karotenoidi, uz djelovanje na imunološki sustav, pokazuju preventivni učinak na razvoj malignih i kardiovaskularnih bolesti (Nabi i sur., 2020).



Slika 1. Podjela polifenolnih i terpenoidnih spojeva

## 2.2. MEDITERANSKO BILJE

### 2.2.1. Kadulja (lat. *Salvia officinalis* L.)



Slika 2. Kadulja (Altindal i Altindal, 2016)

Kadulja pripada rodu *Salvia*, najbrojnijem rodu porodice *Lamiaceae*. Ovaj rod obuhvaća skoro 1000 vrsta od kojih se oko 250 nalazi na mediteranskom području (Walker i sur., 2004). Prema latinskom nazivu ove vrste, ime samog roda *Salvia* prema latinskoj riječi *salvare* znači liječiti, dok *officinalis* označava biljku korištenu u medicinske svrhe, što pokazuje da je od davnina prepoznat njen blagotvoran učinak na zdravlje. Dalmatinska kadulja (*S. officinalis*; slika 2), endemna vrsta koja raste na

obalama Dalmacije i Apeninskog poluotoka, višegodišnja je zimzelena polugrmovita biljka (Tundis i sur., 2020). Samonikla je biljka koja raste na suhim i kamenitim tlima (Galle Toplak, 2001).

Količina bioaktivnih komponenti u kadulji ovisi o brojnim učincima. Maseni udio karotenoida i klorofila ovisi o stadiju rasta biljke, starosti prikupljenog lišća kadulje te izloženosti suncu. U kadulji identificirani su karotenoidi te klorofili *a* i *b* (Rezai i sur., 2018; Martins i sur., 2016; Miladinović i sur., 2015; Murillo Amador i sur., 2014;) te je u navedenim istraživanjima uočena veća količina klorofila *a* u odnosu na klorofil *b*. Od karotenoida, prisutan je  $\beta$ -karoten u najvišim količinama te lutein i zeaksantin (Daly i sur., 2010; Murkovic i sur., 2000). Od polifenolnih spojeva, ružmarinska kiselina dominantan je predstavnik fenola u kadulji, dok su također zastupljeni kava kiselina i njeni derivati (sagerinska i salvionalna kiselina). Od ostalih fenolnih spojeva ističu se flavon glikozidi poput luteolin-7- i luteolin-3-glukuronida i luteolin-glukozida (Velamuri i sur., 2020; Pereira i sur., 2018; Dent i sur., 2017; Dent i sur., 2015). Od flavona, prisutni su i glikozidi apigenina (Velamuri i sur., 2020; Pereira i sur., 2018).

Ekstrakti kadulje često su proučavani zbog snažne biološke aktivnosti te su determinirani brojni farmakološki učinci, među kojima antimikrobno, antioksidativno i protuupalno (Mocan i sur., 2020; Tambur i sur., 2020; Pereira i sur., 2018; Lopresti, 2017; Fu i sur., 2013; Baricevic i Bartol, 2000), antikancerogeno i antimutageno djelovanje (Mocan i sur., 2020; Vuković-Gaćić i sur., 2006; Baricevic i Bartol, 2000) te učinak na poboljšanje kognitivne funkcije i raspoloženja (Kennedy, 2019; Ghorbani i Esmailizadeh, 2017; Shinjyo i Green 2017; Moss i sur., 2010).

### 2.2.2. Timijan (lat. *Thymus vulgaris* L.)



Slika 3. Timijan (Honarmand i sur., 2021)

Timijan (slika 3) je aromatična biljka koja raste u Mediteranskom području. Pripada porodici *Lamiaceae*, rodu *Thymus*, koji sadrži preko 200 vrsta (Nieto, 2020). Naziv timijan, korijenom potječe iz Grčke, značenja parfem, zbog intenzivne arome, ili hrabrost, jer je u antičko i srednjovjekovno doba bio smatran odličnim izvorom okrepljenja. Maleni je višegodišnji grm, koji raste 15 do 30 cm u visinu te oko 40 cm u širinu (Mehta, 2021; Dauqan i Abdullah, 2017). Dobro raste na dobro osunčanim područjima te tlima bazičnog pH (Mehta, 2021). Može se koristiti kao čaj ili kao začim prilikom kuhanja (Dauqan i Abdullah, 2017).

Od karotenoida, u timijanu identificirani su lutein, zeaksantin i  $\beta$ -karoten, od kojih je lutein bio najzastupljeniji. Od klorofila, prisutni su klorofili *a* i *b*, od čega je zastupljeniji bio klorofil *a* (El-Qudah, 2014). Uz brojne monoterpe prisutne u eteričnom ulju timijana, metanolni ekstrakti timijana izvor su flavonola (rutin, kvercetin i kamferol-3-*O*-rutinozid) i fenolnih kiselina (kava, ružmarinska i *p*-kumarinska kiselina), kao i flavanona (hesperidin) te flavona (apigenin i luteolin) (Nieto, 2020; Kuete, 2017).

Uz antimikrobno, antioksidativno i protuupalno djelovanje, timijan ima blagotvoran učinak na respiratorne bolesti poput kašlja i laringitisa (Nieto, 2020; Dauqan i Abdullah, 2017; Kuete, 2017; Prasanth i sur., 2014). Također ima i povoljan učinak na hiperglikemiju, hiperlipidemiju te bubrežnu funkciju (Dauqan i Abdullah, 2017). Zahvaljujući prisutnosti fitokemikalija pokazuje i neuroprotektivno te antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Mehta, 2021; Nieto, 2020; Kubatka i sur., 2019; Kuete, 2017).

### 2.2.3. Lovor (lat. *Laurus nobilis* L.)

U porodicu *Lauraceae* ubrajaju se brojne aromatične i ljekovite biljke, uključuje preko 2500 različitih vrsta, jedna od njih je *Laurus nobilis*, lovor (slika 4). Najpoznatija je biljna vrsta ove porodice, čiji naziv potječe od latinske riječi *nobilis* koja znači plemenito. Domaća je grmolika zimzelena biljka mediteranskog podneblja te se aromatični listovi lovora koriste u kulinarstvu i u medicinske svrhe (Belasli i sur., 2020; Kaurinovic i Vastag, 2019).

Istraživanja o sadržaju karotenoida i klorofila lista lovora su rijetka. Od karotenoida zastupljeni su  $\beta$ -karoten i lutein (Berim i sur., 2015), dok su identificirani i klorofili (Arena i



Slika 4. Lovor (Roviello i Roviello, 2021)

lovor je pokazao i antiproliferativno djelovanje (Bennett i sur., 2013). Utvrđeno je i antidijabetičko djelovanje, kao i blagotvoran učinak na hiperkolesterolemiju i hipertrigliceridemiju (Al-Samarrai i sur., 2017; Aljamal, 2010) te neuroprotektivno djelovanje (Pacifico i sur., 2014).

#### 2.2.4. Tršlja (lat. *Pistacia lentiscus* L.)



Slika 5. Tršlja (Bouyahya i sur., 2019)

sur., 2019).

Od karotenoida, u lišću tršlje identificirani su ksantofili poput zeaksantina, violaksantina i luteina te  $\beta$ -karoten kao predstavnik karotena. Omjer karotenoida i klorofila iznosio je oko 0,30 te je klorofil *a* bio zastupljeniji od klorofila *b* (Said i sur., 2013; Munné-Bosch i Peñuelas, 2003). U odnosu na korijen i plodove tršlje, u lišću su detektirane najviše količine fenolnih spojeva, osobito kondenziranih tanina (Mehenni i sur., 2016; Zitouni i sur., 2016). Detti i sur. (2020) podijelili su polifenolne spojeve lišća tršlje u 3 skupine: galna kiselina i derivati, galotanini i flavonoidi. Od flavonoida, najdominantniji su bili flavonol glikozidi, od kojih su najbrojniji bili kvercetin i miricetin (Detti i sur., 2020; Garofulić i sur., 2020).

sur., 2008). Od polifenolnih spojeva, detektirano je nekoliko flavonol glikozida (Dall'Acqua i sur., 2009), primarno kvercetin i kamferol glikozidi (Kaurinovic i Vastag, 2019; Pacifico i sur., 2014). Detektirano je i nekoliko hidroksicimetnih (ružmarinska i kava kiselina) i hidroksibenzojevih kiselina, te flavoni apigenin i luteolin (Stefanova i sur., 2020; Kaurinovic i Vastag, 2019).

Uz antimikrobno, antioksidativno i protuupalno (Roviello i Roviello, 2021; Kaurinovic i Vastag, 2019),



Ekstrakti tršlje pokazuju antimikrobno (Salhi i sur., 2019; Jalayer-Naderi i sur., 2016), antioksidativno i protuupalno (Chekchaki i sur., 2017), kao i antikancerogeno i antimutageno djelovanje (Bouyahya i sur., 2019; Nahida i sur., 2012). Uz navedeno, pokazuje hepatoprotektivan i antidijabetički učinak (Al-Jawad i sur., 2016; Mehenni i sur., 2016), kao i neuroprotektivno djelovanje (Azib i sur., 2019).

#### 2.2.5. Mirta (lat. *Myrtus communis* L.)



Slika 6. Mirta (Sumbul i sur., 2011)

Porodica *Myrtaeaceae* uključuje 100 rodova te 3000 biljnih vrsta, koje su specifične za područja umjerene, tropske i suptropske klime. *Myrtus* je malobrojan rod, koji pripada ovoj porodici, a uključuje 2 biljne vrste. Vrsta *Myrtus nivelli* raste u području centralne Sahare, dok je vrsta *Myrtus communis* (slika 6) karakteristična samonikla biljka mediteranskog područja (Sisay i Gashaw, 2017). Aromatičan je zimzeleni višegodišnji grm ili malo drvo. Ima aromatično tamnozeleno i sjajno lišće

te okrugle bobice veličine graška, tamne indigo boje (Sumbul i sur., 2011).

List mirte sadrži klorofil *a*, klorofil *b* i manju količinu karotenoida. Od klorofila, zastupljeniji je klorofil *a*, neovisno o dostupnosti svjetlosti (Cioć i sur., 2017; Mendes i sur., 2001). Iz uzorka lista mirte izolirani su tanini, hidroksibenzojeve kiseline (galna i galat kinične kiseline) te miricetin glikozidi (Yoshimura i sur., 2008). Taamalli i sur. (2013) istaknuli su kako brojni čimbenici imaju utjecaj na sadržaj fenolnih spojeva u biljnom tkivu što uzrokuje varijabilnost u literaturnim podacima o dominantnim fenolnim spojevima u lišću mirte. Tako na primjer, neka istraživanja pokazuju najvišu količinu fenolnih kiselina i flavonol glikozida (Cioć i sur., 2017; Taamalli i sur., 2013), a druga značajnu količinu galotanina (Sisay i Gashaw, 2017).

Bobice mirte, uz sadržaj flavonola, a osobito raznih glikozida miricetina, sadrže i antocijane (Sumbul i sur., 2011). Nadalje, identificirani su i spojevi poput galoila i digaloila kinične kiseline (Yangu i sur., 2021). Od svih navedenih, u ekstraktima bobica mirte najdominantniji su antocijani (Tuberoso i sur., 2010), a najzastupljeniji antocijan je malvidin-3-*O*-glukozid (Snoussi i sur., 2012; Messaoud i Boussaid, 2011; Tuberoso i sur., 2010).

Zbog bogatstva biološki aktivnih spojeva ekstrakti mirte pokazuju antimikrobno, antioksidativno i protuupalno djelovanje (Hennia i sur., 2018; Sisay i Gashaw, 2017; Sumbul i sur., 2011). Eksperimentalna istraživanja pokazuju i antikancerogeno, antidijabetičko te

antidijaretičko djelovanje (Sisay i Gashaw, 2017; Jabri i sur., 2016;), dok je uočeno i neuroprotektivno djelovanje ekstrakata mirte (Tumen i sur., 2011).

#### 2.2.6. Pasji trn (lat. *Hippophae rhamnoides* L.)



Slika 7. Pasji trn (Maslo, 2012)

Pasji trn je euroazijska biljna vrsta. Pripada porodici *Elaeagnaceae* (Zakynthinos i Varzakas, 2015) te rodu *Hippophae*, od latinske riječi *hippo* koja znači konj, dok *phaos* u prijevodu znači sjaj, zbog čega se povremeno naziva sjajni konj (Pundir i sur., 2020). Pasji trn (slika 7) otporna je biljka koja dobro preživljava na siromašnim tlima te može rasti na temperaturama od -40 do +40 °C. Grmolika je biljka, a njeni zreli plodovi, odnosno bobice, ovalnog su oblika i najčešće žute, narančaste ili crvene boje. Bobice, lišće i kora pasjeg trna bogati su biološki aktivnim spojevima (Ciesarová i sur., 2020).

Za boju bobica pasjeg trna odgovorni su karotenoidi poput zeaksantina, likopena, luteina i  $\beta$ -karotena, koji je najzastupljeniji (Ciesarová i sur., 2020; Pundir i sur., 2020). Ističu se i sadržajem flavonola (kamferola, kvercetina, izoramnetina i njihovih glikozida), dok su detektirane i fenolne kiseline (Ciesarová i sur., 2020; Pundir i sur., 2020; Suryakumar i Gupta, 2011).

Zahvaljujući sadržaju brojnih biološki aktivnih spojeva pokazuje antimikrobno, antioksidativno i protuupalno te antikancerogeno i antimutageno djelovanje (Pundir i sur., 2020; Zakynthinos i Varzakas, 2015; Suryakumar i Gupta, 2011; Zeb, 2004). Pokazuje i hepatoprotektivno te kardioprotektivno djelovanje, kao i blagotvoran učinak na akutne i kronične rane (Wani i sur., 2016; Suryakumar i Gupta, 2011; Zeb, 2004). Također je utvrđeno antistresno i adaptogeno djelovanje (Wani i sur., 2016; Suryakumar i Gupta, 2011).

#### 2.2.7. Rogač (lat. *Ceratonia siliqua* L.)

Rogač pripada porodici *Leguminosae* (*Fabaceae*) te rodu *Ceratonia* koji uključuje 3 vrste, od kojih je rogač (slika 8) zimzeleno drvo koje raste u mediteranskom području, na suhim područjima sa siromašnim tlima. Plod, odnosno mahuna rogača sastoji se od pulpe (90 %) i sjemenki (10 %) (Lachkar i sur., 2016; Benchikh i Louailèche, 2014).

U istraživanju Nawel i Hariri (2017) nisu identificirani karotenoidi u kloroformnim, metanolnim i vodenim ekstraktima mahuna rogača, dok su u drugim istraživanjima



Slika 8. Rogač (Rtibi i sur., 2017)

identificirani karotenoidi  $\beta$ -karoten, lutein i likopen (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2017; Hadi i sur., 2017). Identificirani su i klorofil *a* i *b*, kao i brojni feofitini (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2017). Od polifenolnih spojeva, ističe se galna kiselina kao glavni fenol u zreloj mahuni rogača (Lakkab i sur., 2018; Ydjedd i sur., 2017; Papagiannopoulos i sur., 2004; Corsi i sur., 2002). Uz galnu kiselinu, prisutni su i kondenzirani tanini, građeni od flavanola i njihovih galoilnih estera (Lakkab i sur., 2018; Papagiannopoulos i sur., 2004), a identificirani su i flavanoli katehin, epigalokatehin, epikatehin galat te epigalokatehin galat (Corsi i sur., 2002). Prisutni su i flavonoli i to u najvećoj mjeri kvercetin i miricetin glikozidi (Alzoubi i sur., 2018; Hadi i sur., 2017; Rtibi i sur., 2017; Ydjedd i sur., 2017; Papagiannopoulos i sur., 2004).

Rogač pokazuje antimikrobno, antioksidativno, imunomodulatorno i antiproliferativno djelovanje (Othmen i sur., 2021; Ammari i sur., 2020; Ayache i sur., 2020; Goulas i sur., 2016; Lachkar i sur., 2016; Nasar-Abbas i sur., 2015), kao i antidijabetičko djelovanje te učinak na snižavanje LDL kolesterola i triglicerida (Goulas i sur., 2016; Nasar-Abbas i sur., 2015). Dodatno se ističe i djelovanje poput antidijaretika te neuroprotektivno djelovanje (Lakkab i sur., 2018; Goulas i sur., 2016).

### 2.3. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Prilikom izdvajanja biološki aktivnih komponentama koje se prirodno nalaze u biljkama, ekstrakcija je neizostavan proces (Belwal i sur., 2018). Ekstrakcija podrazumijeva tehnološku operaciju prilikom koje se smjese tvari, nejednake topljivosti u različitim otapalima, odvajaju potpuno ili djelomično (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kod ljekovitih i aromatičnih biljaka, ekstrakcija se provodi u svrhu izdvajanja sekundarnih biljnih metabolita ili aktivnog biljnog materijala od inertnog ostatka biljke. Odabir metode ekstrakcije ovisi o brojnim čimbenicima: otpornost biljnog materijala na visoke temperature, priroda otapala, cijena biljnog uzorka, vremensko trajanje ekstrakcije, potreban volumen ekstrakta te primjena dobivenog ekstrakta (Abubakar i Haque, 2020).

Zbog varijabilnosti struktura bioaktivnih spojeva, potrebno je pomno odabrati optimalnu metodu ekstrakcije budući da daljnji koraci poput izdvajanja i identifikacije spojeva ovisi o kvaliteti dobivenog ekstrakta (Da Silva i sur., 2016). Konvencionalne metode sve se više zamjenjuju novijim metodama ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

(eng. *Ultrasound-Assisted Extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (eng. *High-Pressure Assisted Extraction*, HPAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE) te ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub> (eng. *Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction*, SCO<sub>2</sub>), koje omogućuju (Putnik i sur., 2018):

- Bolju izolaciju
- Veću selektivnost
- Smanjenu potrošnju energije
- Korištenje alternativnih otapala
- Visoku kvalitetu ekstrakta
- Ekološku prihvatljivost

UAE često je korištena za ekstrakciju eteričnih ulja i biološki aktivnih spojeva (Abubakar i Haque, 2020; Belwal i sur., 2018; Fahim i sur., 2017; Da Silva i sur., 2016). Prije provođenja ekstrakcije biljne uzorke potrebno je osušiti, usitniti, uzorku dodati odgovarajuće otapalo te se tako pripremljeni uzorak pomoću ultrazvučne sonde (direktno) ili kupelji (indirektno) podvrgava ultrazvučnim valovima frekvencije veće od 20 kHz (Abubakar i Haque, 2020). Najčešće se koriste frekvencije od 20 do 100 kHz (Chemat i sur., 2017), dok su za biološki aktivne spojeve optimalne frekvencije od 20 do 40 kHz (Kumar i sur., 2021; Drmić i Režek Jambrak, 2010). Takve frekvencije ultrazvučnih valova uzrokuju fluktuacije tlaka zbog čega dolazi do fenomena kavitacije, odnosno stvaranje, rast i pucanje mjehurića plina, koji svojim raspadom proizvode ekstremne lokalne uvjete – temperaturu koja može doseći i preko 5000 °C te tlak do 101325 kPa. Kada mjehurić pukne u blizini ili na površini krutog materijala dolazi do raspada stanica krutog materijala što uzrokuje bolje otapanje unutarstaničnog sadržaja poput biološki aktivnih spojeva i eteričnog ulja (Kumar i sur., 2021; Knez Hrnčič i sur., 2020; Belwal i sur., 2018; Chemat i sur., 2017; Gil-Chávez i sur., 2013; Drmić i Režek Jambrak, 2010). UAE ovisna je o veličini uzorka, pH, tlaku, temperaturi i korištenom otapalu. Najčešće se kao otapalo koriste voda, metanol, aceton i etil-acetat (Da Silva i sur., 2016).

UAE ima brojne prednosti u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji je jednostavna radi korištenja uobičajene laboratorijske opreme (Altemimi i sur., 2017; Da Silva i sur., 2016), omogućava analiziranje više uzoraka istovremeno (Da Silva i sur., 2016), kraće vrijeme ekstrakcije, manji volumen potrebnog otapala, nižu temperaturu ekstrakcije te veću količinu ekstrahiranih spojeva (Kumar i sur., 2021; Abubakar i Haque, 2020; Knez Hrnčič i sur., 2020; Belwal i sur., 2018; Putnik i sur., 2018; Altemimi i sur., 2017; Fahim i sur., 2017; Da Silva i sur., 2016; Gil-Chávez i sur., 2013). S druge strane, tijekom

ekstrakcije energija ultrazvuka može dovesti do produkcije slobodnih radikala – reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Nastali slobodni radikali mogu uzrokovati nepoželjne promjene na molekulama uzorka, odnosno degradaciju fitokemikalija (Abubakar i Haque, 2020; Belwal i sur., 2018; Fahim i sur., 2017).

Za optimalnu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva potrebno je optimizirati frekvenciju ultrazvučnih valova, temperaturu, vrijeme ekstrakcije, otapalo te omjer otapala i suhog uzorka (Kumar i sur., 2021). Dodatno, provođenjem uzastopne ekstrakcije korištenjem otapala rastuće polarosti moguće je dobiti frakcije koje sadrže različite vrste biološki aktivnih spojeva. Tako će u nepolarnim otapalima zaostati nepolarni spojevi poput karotenoida i klorofila, dok će u polarnijem otapalu zaostati polarne komponente poput monomernih ili oligomernih fenola (Conde i sur., 2014).

#### 2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA LJEKOVITOG I AROMATSKOG BILJA

Antioksidans je tvar koja, kada je prisutna u niskoj koncentraciji u odnosu na koncentraciju oksidirajućeg supstrata, značajno odgađa ili sprječava oksidaciju tog supstrata (Halliwell, 1996). U zdravom organizmu, reaktivne kisikove i dušikove vrste u ravnoteži su s antioksidansima. Kada je ljudsko tijelo pod stresom, dolazi do remećenja ravnoteže prema većoj koncentraciji reaktivnih vrsta – to stanje nazivamo oksidativni stres. Takvo stanje može prouzročiti nastanak brojnih kroničnih nezaraznih bolesti. Upravo iz ovog razloga, molekule antioksidanasa slove kao ključni igrači u sprječavanju razvoja bolesti (Rojas i Buitrago, 2019; Zhong i Shahidi, 2015). Antioksidacijska aktivnost odnosi se na sposobnost kemijske tvari ili smjese kemijskih tvari da uspori ili spriječi oksidaciju drugih molekula prilikom istodobne izloženosti reaktivnim vrstama. Kvantitativna je mjera otpornosti na utjecaj reaktivnih vrsta (Jordamović i sur., 2020). Zbog prisutnosti brojnih biološki aktivnih spojeva, koji između ostalog djeluju i kao antioksidansi, povećan je znanstveni interes u određivanju antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata (Rojas i Buitrago, 2019).

Prema načinu djelovanja antioksidativne metode dijelimo u dvije skupine: SET (eng. *Single Electron Transfer* – temelje se na mjerenju sposobnosti kojom antioksidans reducira oksidans pri čemu mijenja početnu boju. Stupanj promjene boje ovisi o koncentraciji antioksidansa u uzorku) i HAT (eng. *Hydrogen-Atom Transfer* – mjere sposobnost kojom se antioksidans veže na slobodne radikale doniranjem vodikovog atoma). Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se indirektna (DPPH, ABTS+, FRAP) i direktne metode

(ORAC, određivanje antioksidacijske aktivnosti s  $\beta$ -karotenom), a zbog kompleksnih oksidacijskih procesa vrlo često se koriste različite metode (Pisoschi i Negulescu, 2011).

Najčešće korištena metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti je DPPH metoda jer je jednostavna i brza te neovisna o polarnosti mjenenog uzorka (Rojas i Buitrago, 2019; Marxen i sur., 2007). Metoda se provodi korištenjem stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, koji je komercijalno dostupan i jednostavan za upotrebu (Niki, 2010). Delokalizacija nesporenog elektrona na aromatski prsten molekule pruža DPPH radikalu stabilnost te je uzrok ljubičastog obojenja otopine DPPH radikala (Gupta, 2015; Pisoschi i Negulescu, 2011). Brojni antioksidansi reagiraju s DPPH radikalom donirajući atom vodika ili elektron s posljedičnim premještanjem protona (Niki, 2010). Reakcija antioksidansa i DPPH radikala dovodi do redukcije radikala te posljedične promjene obojenja otopine u bezbojnu do svjetlo žutu boju (Rojas i Buitrago, 2019; Gupta, 2015; Pisoschi i Negulescu, 2011). Apsorbancija se mjeri na UV/VIS spektrofotometru (eng. *UltraViolet/VISible Spectrophotometer*) na valnim duljinama od 515 do 520 nm (Niki, 2010; Marxen i sur., 2007). Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona, odnosno gubitak boje proporcionalan je koncentraciji antioksidanasa u otopini (Gupta, 2015; Pisoschi i Negulescu, 2011; Niki, 2010; Prior i sur., 2005). Niska apsorbancija indikativan je pokazatelj visoke aktivnosti hvatanja radikala (Rojas i Buitrago, 2019).

Najčešće se kao standard koristi otopina Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonksilna kiselina), vodeno topljivog analoga vitamina E (Rojas i Buitrago, 2019; Gupta, 2015; Pisoschi i Negulescu, 2011) i stoga se antioksidacijska aktivnost izračunava na ekvivalentnu koncentraciju Trolox-a, tj. na ekvivalent Trolox-a (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC) (Rice-Evans i sur., 1996).

## 2.5. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA BILJNIH EKSTRAKATA

Biljni ekstrakti sadrže brojne biološki aktivne spojeve, koji se strukturno razlikuju što predstavlja veliki izazov prilikom identifikacije i kvantifikacije. Za odvajanje i identifikaciju koriste se različite metode, a posljednjih godina najčešće se koristi kombinacija tekućinske kromatografije vrlo visoke učinkovitosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) i dvojne spektrometrije masa (eng. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS) (Boligon i Athayde, 2014).

### 2.5.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (eng. *Liquid Chromatography*, LC) je vrsta kromatografije koja služi za odjeljivanje otopljenih tvari. Mobilna faza je tekućina i naziva se eluens, dok se stacionarna faza nalazi u koloni kroz koju putuje uzorak. Tvari iz otopina imaju različito međudjelovanje s mobilnom i stacionarnom fazom ovisno o razlici u adsorpciji, izmjeni iona i razdjeljenjima između faza (Sasidharan i sur., 2010).

#### 2.5.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) koristi se za izolaciju prirodnih spojeva (Cannell, 1998), odnosno za identifikaciju, kvantifikaciju i odvajanje individualnih spojeva iz biljnih ekstrakata (Boligon i Athayde, 2014).

Prednosti HPLC-a u usporedbi s ostalim kromatografskim tehnikama su relativno visoki radni tlak (do 400 bara), mali promjer čestica punila, mali promjer kolone, osjetljivi detektori za detekciju male količine analita, visoki stupanj separacije i brza analiza (Boligon i Athayde, 2014).

Uređaj se sastoji od pumpe za dopremu otapala, uređaja za uvođenje uzorka (ventil za ručno uvođenje ili uređaj s automatskim uvođenjem uzorka), kolone i detektora. Ovisno o vrsti spoja kojeg je potrebno identificirati odabire se prikladno otapalo, kolona, temperatura na kojoj se kolona zagrijava te detektor. Ovisno o odabiru stacionarne i mobilne faze kromatografiju možemo podijeliti na kromatografiju normalne faze, u kojoj se koristi polarna stacionarna faza i manje polarna mobilna faza, dok se u kromatografiji obrnute faze koristi nepolarna stacionarna faza i polarnija mobilna faza (Harris, 2010). Kromatografija obrnute faze se češće koristi zbog njene jednostavnosti i široke primjene jer može razdvojiti spojeve različite polarnosti i molekularne mase, što ju čini pogodnom za identificiranje sekundarnih biljnih metabolita (Boligon i Athayde, 2014).

Odjeljivanje spojeva pomoću HPLC-a zasniva se na forsiranju prolaska otopljene tvari kroz kolonu uz pomoć pumpanja mobilne faze pod visokim tlakom. Kada otopljena tvar prođe kroz kolonu i dođe do detektora kažemo da se ona eluirala, dok vrijeme koje je bilo potrebno da se eluira nazivamo retencijskim vremenom. Retencijsko vrijeme specifično je za svaki pojedini kemijski spoj, a ovisi o njegovoj tendenciji zadržavanja na stacionarnoj fazi (Harris, 2010). Postoje dvije vrste elucije. Izokratska elucija, prilikom koje se koristi jedna mobilna faza koja se ne mijenja tijekom elucije, dok se u gradijentnoj eluciji koristi više mobilnih faza različite

snage elucije te se njihov omjer mijenja tijekom elucije. Gradijentna elucija koristi se kada je uzorak koji se analizira kompleksnijeg sastava (Sasidharan i sur., 2010).

#### 2.5.1.2. *Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti*

Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) je kromatografska metoda vrlo slična HPLC-u osim što se koriste znatno veći tlakovi do 1000 bara za prolaz mobilne faze kroz stacionarnu fazu zbog čega je ubrzano vrijeme analize, odnosno poboljšana detekcija i razdvajanje. Kod UPLC metode koriste se kolone s manjim unutarnjim promjerima napunjene materijalima sa česticama manje veličine (1,8  $\mu\text{m}$ ), na koje se djeluje većim brzinama protoka i višim temperaturama. Vrijeme trajanja UPLC analize je 3-10 min, dok je kod HPLC analize potrebno duže vrijeme (15-40 min) čime je smanjena potrošnja otapala. Iako UPLC ima prednosti nad HPLC-om, i dalje je zastupljenija HPLC metoda (De Villiers i sur., 2006).

#### 2.5.1.3. *Detekcija*

Kako bi se bilo koji kemijski spoj identificirao, potrebno je odabrati prikladan detektor. Najčešće korišten je UV detektor zahvaljujući njegovoj visokoj osjetljivosti i iz razloga što brojne otopljene tvari imaju apsorpcijske maksimume niskih valnih duljina (190-210 nm) (Sasidharan i sur., 2010). DAD detektor funkcionira na isti način, no njegova prednost je što omogućava usporedbu različitih spektara, što olakšava identifikaciju spojeva (Aguilar i sur., 1996). Postoje i drugi detektori poput ELSD detektora (eng. *Evaporative Light Scattering Detector*), koji se koristi za hlapljive tvari te ECD detektor (eng. *ElectroChemical Detection*), koji se koristi za tvari koje se mogu oksidirati ili reducirati (Harris, 2010).

Maseni detektor detektira spojeve na osnovi njihove molekulske mase. Masena spektrometrija (MS) koristi se za odjeljivanje komponenata smjese i detekciju nabijenih čestica na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Na kretanje nabijene čestice kroz medij utječe magnetsko polje. Omjer mase i naboja čestice određuje različito skretanje molekule u magnetskom polju. Spektrometrija masa sastoji se od 3 dijela. Prvi je izvor u kojem se uzorci ioniziraju, odnosno prevode u plinovito i nabijeno stanje. Drugi dio je analizator, gdje dolazi do razdvajanja molekula prema omjeru mase i naboja, a posljednji dio je detektor u kojem se određuje količina analita za svaki omjer mase i naboja (Chace i Kalas, 2005). Odabir izvora iona, analizator i detektor iona odabiru se ovisno o vrstama analiza (kvalitativna, kvantitativna ili strukturna). U svrhu pojednostavljenja analiza razvili su se različiti pretraživači baza podataka i programske aplikacije (Cindrić i sur., 2009).

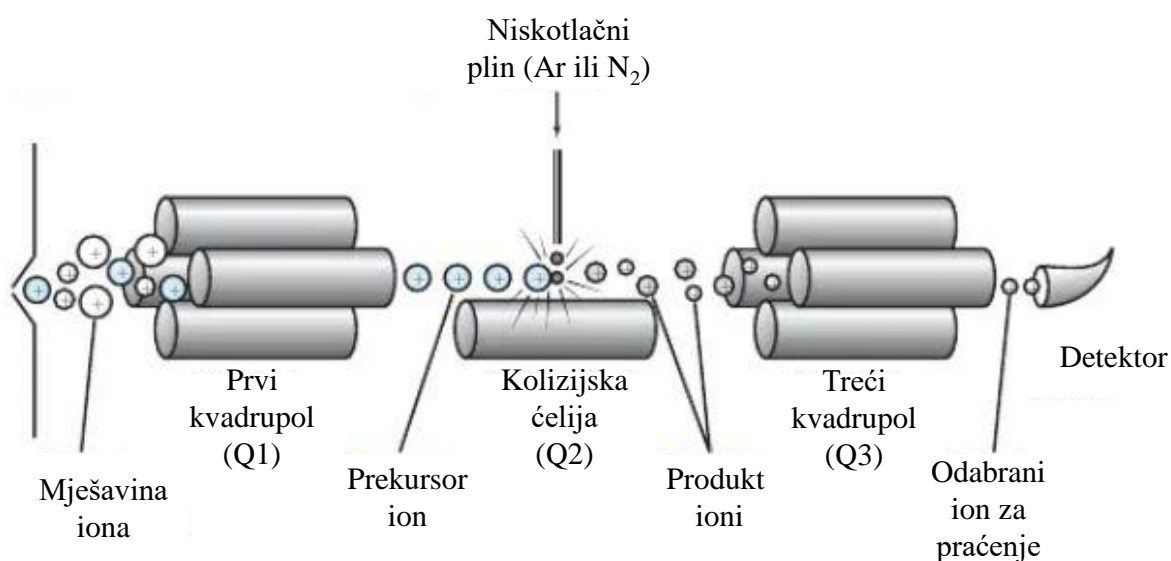


U biljnim ekstraktima nalaze se brojni polifenolni spojevi koji se razlikuju prema polarnosti i veličini molekule te su obično zastupljeni u malim koncentracijama. Iz tog razloga, LC-MS/MS tehnika najbolji je odabir za određivanje polifenola kako niske, tako i visoke molekularne mase (Donno i sur., 2020; Lucci i sur., 2017).

Molekule prisutne u ekstraktu se ioniziraju, najčešće ionizacijom pri atmosferskom tlaku (eng. *Atmospheric Pressure Ionisation*, API), kemijskom ionizacijom pod atmosferskim tlakom (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, APCI) i elektrosprej ionizacijom (eng. *ElectroSprey Ionisation*, ESI) (Harris, 2010; Thurman i sur., 2005). Metoda ionizacije istovremeno prevodi uzorak iz tekućeg ili krutog stanja u plinovito, te ga prevodi u ionizirano stanje. Kako je analiza moguća jedino za molekule u ionskom obliku, u izvoru dolazi do stvaranja prekursor iona (Pitt, 2009; Chace i Kalas, 2005). Slijedi analiza nastalih iona i njihovih fragmenata temeljem omjera  $m/z$  (Pitt, 2009). Ovisno o specifičnom  $m/z$ , ioni u analizatoru, pod utjecajem električnog ili magnetskog polja, različito ubrzavaju i skreću te se razdvajaju (Chace i Kalas, 2005; Ho i sur., 2003; Hoffmann, 1996). Retencijsko vrijeme i uzorak fragmentacije iona jedinstven je za svaki spoj što omogućava njihovu identifikaciju (Tolstikov i Fiehn, 2002). Analizatori mase koji se koriste su TOF (eng. *Time of Flight*) analizator, kvadrupol filter masa, magnetni filter masa, ionska klopka (eng. *Ion Trap*) te orbitalna klopka (eng. *Orbitrap*). Najčešće korišteni analizator je trostruki kvadrupol (eng. *Triple Quadrupol*, QQQ) filter masa također poznati kao dvojni maseni spektrometri (eng. *Tandem Mass Spectrometers*, MS/MS), koji se sastoji od dva kvadrupola i kolizijske ćelije čiji razmještaj omogućuje kontroliranu fragmentaciju iona. Sastoji se od 4 električki povezane elektrode, dvije pozitivno, a dvije negativno nabijene. Parovi elektroda su također povezani i radiofrekvencijskim potencijalom izmjenične struje. Različiti ioni koji ulaze u analizator, ovisno o struji i električnom polju zadržavaju putanju i prolaze kroz analizator ili doticanjem elektroda postaju neutralne molekule (Ho i sur., 2003). Izmjenom električnog polja i mijenjanjem frekvencije između parova elektroda omogućeno je skretanje i filtriranje iona određenih masa i naboja. Ioni koji nisu rezonantni određenoj frekvenciji skreću u jednu od elektroda, dok rezonantni ioni prolaze do detektora. Zatim kvadrupol detektor selektira i određuje jednu po jednu masu. Kako bi se poboljšala osjetljivost i specifičnost analize, selektirane prekursor ione moguće je podvrgnuti fragmentaciji u drugom spektrometru masa te kao rezultat proizlaze fragmentirani ioni (Dasgupta i Wahed, 2014; Cindrić i sur., 2009).

U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija povezana s dvojnog spektrometrijom masa (slika 9). LC-MS/MS uređaj sastoji se od ionizacijskog izvora (najčešće ESI ili APCI) povezanog s komponentom za ulaz iona i njihovo fokusiranje. Slijedi prvi kvadrupol masa (Q1),

koji propušta samo one ione koji imaju specifičan omjer  $m/z$  u kolizijsku ćeliju. Ion koji dopiye u kolizijsku ćeliju naziva se molekularni ili prekursor ion. Kolizijska ćelija (Q2) može se napuniti niskotlačnim plinom (argon ili dušik) gdje izabrani ioni kolidiraju tj. sudaraju se s molekulama inertnog plina i fragmentiraju u produkt ione. Produkt ioni dolaze do trećeg kvadrupola (Q3), gdje će biti ponovno selektirani na temelju  $m/z$  odnosno odabiru se specifični fragment ioni (produkt ioni), koji zatim putuju do detektora gdje se detektiraju i kvantificiraju te se snima maseni spektar (Agilent Technologies, 2017; Grebe i Singh, 2011; Harris, 2010). Softver analizira spektar odnosno uspoređuje sve mase s onima koje se nalaze u bazi podataka (Seger i Griesmacher, 2007; Ho i sur., 2003)



Slika 9. Princip dvojne spektrometrije masa (prema Harris, 2010)

Takav instrument omogućava provođenje nekoliko vrsti eksperimenata (Agilent Technologies, 2017; Grebe i Singh, 2011):

- Kompletno skeniranje (eng. *Scan Mode*) - snima se cijeli raspon masa, a kolizijska ćelija nije napunjena plinom. Omogućuje uvid u sve ione sadržane u uzorku.
- Skeniranje produkt iona (eng. *Product Ion Scan*) – odabire se specifičan  $m/z$  omjer u Q1, kolizijska ćelija (Q2) se puni plinom da se odabrani prekursor ion fragmentira te se snima cijeli raspon masa u Q3. Omogućuje uvid u sve produkt ione odabranog prekursor iona.
- Skeniranje prekursor iona (eng. *Precursor Ion Scan*) – skeniranje cijelog masenog raspona Q1, kolizijska ćelija (Q2) se puni plinom, dolazi do fragmentacije svih iona, a zatim se odabire specifičan omjer  $m/z$  u Q3. Omogućuje utvrđivanje onog prekursor iona koji bi mogao dovesti do odabranog produkt iona.

- Skeniranje neutralnog gubitka (eng. *Neutral Loss Scan*) – snima se cijeli raspon masa Q1, kolizijska ćelija (Q2) se puni plinom, dolazi do fragmentacije svih iona, traže se oni produkt ioni koji odgovaraju gubitku jedne specifične mase izazvane fragmentacijom. Omogućuje utvrđivanje prekursor iona koji su fragmentacijom izgubili istu kemijsku grupu.
- Selektivno (ili višestruko) praćenje reakcije [eng. *Selective (or Multiple) Reaction Monitoring*] – odabire se jedan specifični  $m/z$  u Q1, koji se u kolizijskoj ćeliji (Q2) fragmentira, a zatim odabere jedan specifični  $m/z$  od tih fragmenata u Q3. Ovaj način omogućava vrlo specifično određivanje spojeva.

Tijekom posljednjih godina kombinacija UPLC i MS/MS, postala je pouzdani analitički postupak analize malih organskih molekula u femtomolskom rasponu (Seger i Griesmacher, 2007).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. UZORCI LJEKOVITOG I AROMATSKOG BILJA

Osušeno lišće lovora (*Laurus nobilis* L.), timijana (*Thymus vulgaris* L.), kadulje (*Salvia officinalis* L.) i tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) nabavljeno je kod lokalnog proizvođača (Suban, Strmec Samoborski, Hrvatska) tijekom veljače 2020. godine. Zrele mahune rogača (*Ceratonia siliqua* L.) i bobice pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) su nabavljeni od lokalnog proizvođača (Jerkin, Zadar, Hrvatska), a lišće i bobice mirte (*Myrtus communis* L.) su prikupljeni od strane lokalnog uzgajivača (Turanj, Hrvatska) te nakon prikupljanja sušeni u laboratorijskom sušioniku 24 h pri 30 °C. Svi uzorci ljekovitog bilja skladišteni su na suhom i tamnom mjestu te su neposredno prije provođenja analiza usitnjeni u mehaničkoj drobilici do sitnih čestica.

#### 3.2. ODREĐIVANJE UKUPNE SUHE TVARI

##### 3.2.1. Aparatura

- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Firenca, Italija)
- Laboratorijski sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator (LLG-Labware, Meckenheim, Njemačka)

##### 3.2.2. Pribor

- Aluminijske posudice s poklopcem
- Kvarcni pijesak
- Stakleni štapići
- Pipeta od 2 mL

##### 3.2.3. Postupak određivanja suhe tvari

Kako bi se odredila suha tvar uzoraka, prethodno je potrebno pripremiti aluminijske posudice s poklopcem. U osušene i izvagane posudice doda se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se one suše u sušioniku pri temperaturi od 105 °C oko 2 h sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja, zatvorena posudica se hladi u eksikatoru te izvaže s točnošću od  $\pm 0,0002$  g. U pripremljenu posudicu otpipetira se oko 2 mL ekstrakta te se izmiješa s kvarcnim pijeskom pomoću staklenog štapića. Sve zajedno se važe s točnošću od  $\pm 0,0002$  g. Tako pripremljeni uzorak se suši u sušioniku pri  $105 \pm 0,5$  °C 60 min sa zaklopljenim poklopcem. Nakon hlađenja u eksikatoru i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva

uzastopna sušenja, u razmaku od 30 min ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću  $\pm 0,0002\text{g}$ . Ukupna suha tvar uzorka određuje se prema formuli [1]:

$$\text{ukupna suha tvar}(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \quad [1]$$

Gdje je:

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

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

$m_2$  – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g)

### 3.3. UZASTOPNA UAE

#### 3.3.1. Kemikalije

- *n*-heksan (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Etil-acetat (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Aceton, 80 %-tni (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Etanol, 96 %-tni (Lach-ner, Neratovice, Češka)

#### 3.3.2. Aparatura

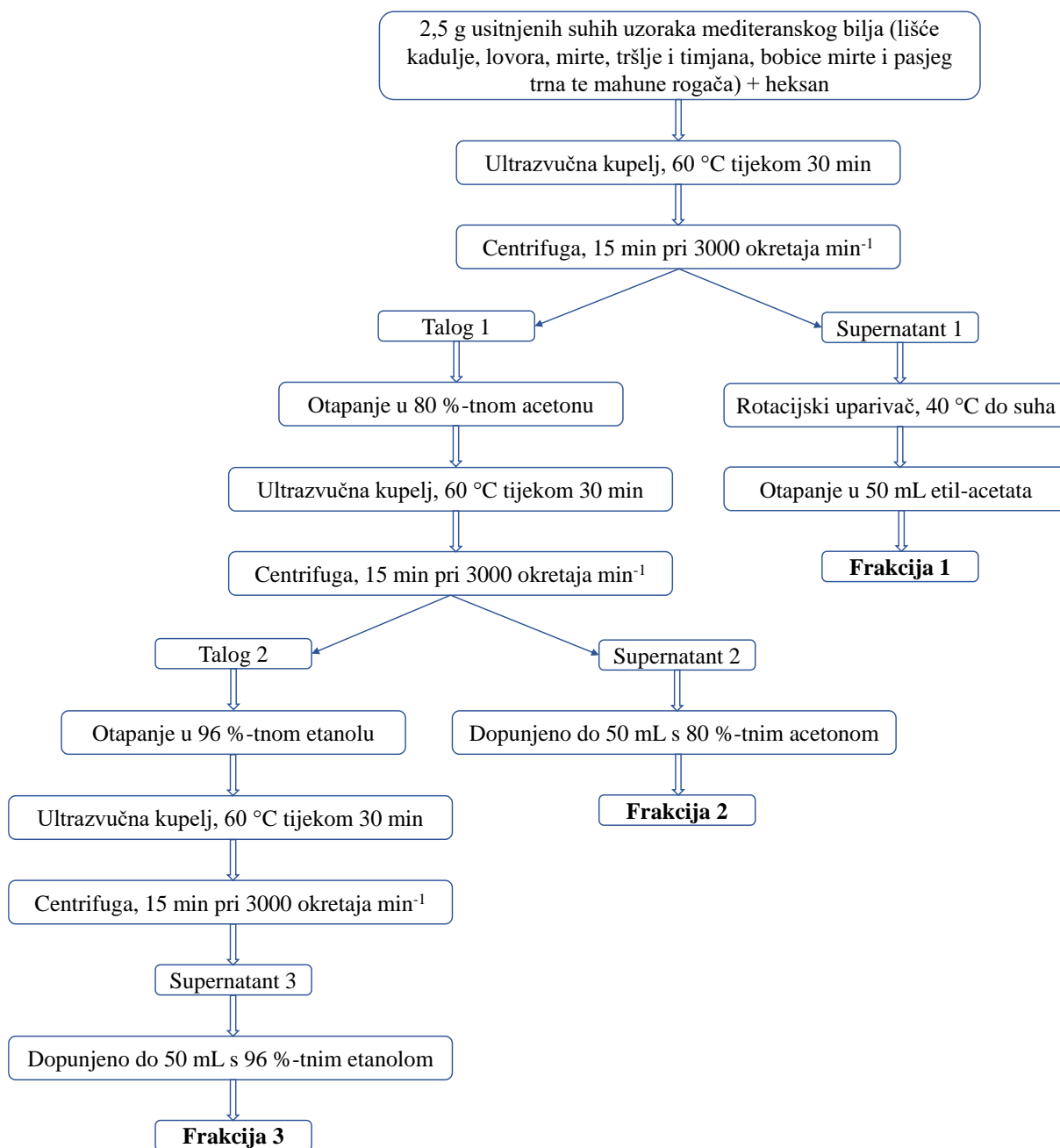
- Tehnička vaga Mettler (Mettlet Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex, Berlin, Njemačka)
- Centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Rotacijski uparivač (RV 10, IKA, Staufen, Njemačka)

#### 3.3.3. Pribor

- Plastične lađice za vaganje
- Falcon epruvete, volumena 25 mL
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapići
- Filter papir
- Odmjerne tikvice, volumena 50 mL
- Chromafil Xtra filter (PET-45/25 0,45  $\mu\text{m}$ )
- Automatska mikropipeta
- Viale s poklopcem

#### 3.3.4. Postupak UAE

Odvaž se 2,5 g usitnjenog uzorka s točnošću  $\pm 0,1$  g i homogenizira se s 50 mL heksana u falcon epruveti te se ekstrakcija provodi pomoću ultrazvučne kupelji pri temperaturi od 60 °C tijekom 30 min. Nakon ekstrakcije, ekstrakti se ohlade te centrifugiraju 15 min pri 3000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Dobiveni supernatant se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu te koncentrira u rotacijskom uparivaču pri temperaturi od 40 °C do suha te se otopi u 50 mL etil-acetata (frakcija 1). Zaostali talog se ponovno ekstrahira u 80 %-tnom acetonu pri istim ekstrakcijskim uvjetima te se nakon hlađenja i centrifugiranja supernatant kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni s ekstrakcijskim otapalom, odnosno 80 %-tnim acetonom (frakcija 2). Talog zaostao nakon centrifugiranja ponovno se ekstrahira u 96 %-tnom etanolu u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 60 °C tijekom 30 min. Nakon ekstrakcije, hlađenja i centrifugiranja, supernatant se prebaci u odmjernu tikvicu od 50 mL te se nadopuni sa 96 %-tnim etanolom (frakcija 3). Frakcije 1-3 čuvane su na tamnom mjestu pri temperaturi -18 °C do daljnjeg korištenja (ne dulje od 10 dana). Na slici 10 prikazan je shematski postupak ultrazvučne sukcesivne ekstrakcije.



Slika 10. Shematski prikaz uzastopne UAE

Navedeni ekstrakti, odnosno frakcije 1, 2 i 3, korišteni su za identifikaciju i kvantifikaciju pigmenta i fenolnih spojeva kao i za određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti. Prije provođenja kromatografskih analiza ekstrakti su filtrirani kroz Chromafil Xtra filter u viala za injektiranje.

### 3.4. ODREĐIVANJE PIGMENATA PRIMJENOM HPLC-UV-VIS/DAD METODE

#### 3.4.1. Kemikalije

- Metanol (Fisher Chemicals, Merelbeke, Belgija)

- Metil tert-butil eter (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Destilirana voda

### 3.4.2. Aparatura

- HPLC uređaj (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- UV-VIS/DAD detektor (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

### 3.4.3. Kromatografska analiza

Za određivanje pigmenata (karotenoidi i klorofili) u ekstraktima biljaka (frakcijama 1-3) koristila se HPLC uz UV/VIS-Diode Array detekciju (HPLC-UV-VIS/DAD) prema metodi koju su opisali Castro-Puyana i sur. (2017). Za kontrolu uređaja i obradu podataka korišten je Chemstation program (ver. C.01.03).

#### 3.4.3.1. *Uvjeti kromatografskog određivanja karotenoida i klorofila:*

Kolona:	Develosil C30, 3 $\mu\text{m}$ (250 $\times$ 4,6 mm I.D.)
Predkolona:	Develosil Guard Catridge holder, Phenomenex, USA
Pokretna faza:	otapalo A: metanol : metil tert-butil eter : voda (90:7:3, v/v/v) otapalo B: metanol : metil tert-butil eter (10:90, v/v)
Protok:	0,8 mL min <sup>-1</sup>
Detektor:	UV-VIS/DAD ( $\lambda$ 450 nm, 660 nm)
Temperatura:	35 °C
Vrijeme trajanja:	52 min
Injektirani volumen:	10 $\mu\text{L}$
Vrijeme uravnoteženja kolone:	2 min
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 1



Tablica 1. Gradijent za HPLC-UV-VIS/DAD analizu karotenoida i klorofila

<b>t (min)</b>	<b>Otapalo A (%)</b>	<b>Otapalo B (%)</b>	<b>Protok (mL min<sup>-1</sup>)</b>
0	100	0	0,8
20	70	30	0,8
35	50	50	0,8
45	20	80	0,8
50	0	100	0,8
52	100	0	0,8

#### 3.4.4. Identifikacija i kvantifikacija karotenoida i klorofila

Identifikacija karotenoida (lutein, 9-cis lutein, zeaksantin i  $\beta$ -karoten) i klorofila (klorofil *b*, klorofil *b'*, klorofil *a*, klorofil *a'*, feofitin *b*, feofitin *b'*, feofitin *a*, feofitin *a'*) provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (*t*R) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom karakterističnih UV/VIS spektara. Određivanje karakterističnih UV/VIS spektara provedeno je skeniranjem spektra u području valnih duljina od 240 do 770 nm. Identifikacija karotenoida provedena je pri 450 nm, a klorofila pri 660 nm. Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih karotenoidnih i klorofilnih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva (tablica 2).

Tablica 2. Baždarne jednadžbe standardnih spojeva

<b>Spoj</b>	<b>Baždarna krivulja</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Lutein	$y = 43,069 x$	0,99
Klorofil <i>a</i>	$y = 35,932 x$	0,97
Klorofil <i>b</i>	$y = 13,326 x$	0,98

Spojevi iz skupine karotenoida izraženi su kao ekvivalent luteina, dok su derivati klorofila *a* izraženi kao ekvivalent klorofila *a*, a derivati klorofila *b* kao ekvivalent klorofila *b*. Masene koncentracije analiziranih spojeva prikazane su kao mg 100 g<sup>-1</sup> suhe tvari uzorka.

### 3.5. ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA PRIMJENOM UPLC-MS/MS METODE

#### 3.5.1. Kemikalije

- Mravlja kiselina (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

- Acetonitril (Fisher Chemicals, Merelbeke, Belgija)
- Destilirana voda

### 3.5.2. Aparatura

- UPLC sustav (1290 RRLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- 6430 maseni spektrometar Agilent Technologies (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

### 3.5.3. Postupak određivanja

Za određivanje fenolnih spojeva korišten je UPLC-MS/MS. Tijekom određivanja sadržaja pojedinih polifenola u ekstraktima biljaka koristila se ESI u pozitivnom i negativnom modu. ESI koristi električnu energiju kako bi se potaknuo prijenos iona iz otopine u plinovitu fazu prije odvijanja masene spektrometrije.

Pojedinačni fenolni spojevi određeni su u uzorcima prema metodi koju su prethodno opisali Garofulić i sur. (2018). Za kontrolu uređaja i obradu podataka korišten je program Agilent MassHunter Workstation (ver. B.04.01).

#### 3.5.3.1. *Uvjeti kromatografskog određivanja fenolni spojeva:*

Kolona:	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 $\mu\text{m}$ (100 $\times$ 2,1 mm I.D.)
Pokretna faza:	otapalo A: 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
Detektor:	MS/MS trostruki kvadropol (Agilent 6430 QqQ)
Ionski izvor:	ESI
MS parametri:	temperatura plina: 300 $^{\circ}\text{C}$ protok plina ( $\text{N}_2$ ): 11 L $\text{min}^{-1}$ nebulizer: 40 psi napon na kapilari: +4000 V; -3500 V maseni detektor: MRM mode ( $m/z$ od 50 do 1000)
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 3
Temperatura:	35 $^{\circ}\text{C}$
Vrijeme trajanja:	12,5 min
Injektirani volumen:	2,5 $\mu\text{L}$

Tablica 3. Gradijent za LC-MS/MS analizu fenolnih spojeva (Garofulić i sur., 2018)

<b>t (min)</b>	<b>Otapalo A</b>	<b>Otapalo B</b>	<b>Protok (mL min<sup>-1</sup>)</b>
0	95	5	0,3
10	65	35	0,3
10,1	20	80	0,3
11	20	80	0,3
11,1	95	5	0,3
12,5	95	5	0,3

Za identifikaciju spojeva na UPLC MS/MS-u za koje ne postoje standardi prekursor i produkt iona te polariteti određeni su prema literaturnim podacima (tablica 4) (Sharma i sur., 2020; Maldini i sur., 2016; Carochi i sur., 2014; Barros i sur., 2013; Pop i sur., 2013; Pinheiro i Justino, 2012; Hossain i sur., 2010; Montoro i sur., 2006; March i Miao, 2004).

Tablica 4. Podaci masene spektrometrije i identifikacija fenolnih spojeva

<b>Flavonoidi</b>	<b>Prekursor ion (m/z)</b>	<b>Produkt ion (m/z)</b>	<b>Polaritet</b>
<i>Flavonoli</i>			
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	465	303,1	Pozitivan
Kvercetin-3- <i>O</i> -pentozid	435	303	Pozitivan
Kvercetin-3- <i>O</i> -arabinozid	449	303	Pozitivan
Kvercitrin	449	303	Pozitivan
Kvercetin acetil-rutinozid	653	303	Pozitivan
Kvercetin-3- <i>O</i> -soforozid-7- <i>O</i> -ramnozid	773	449; 303	Pozitivan
Kamferol	287	147	Pozitivan
Kamferol-3- <i>O</i> -rutinozid	595	287	Pozitivan
Kamferol-3- <i>O</i> -ramnozid	433	287	Pozitivan
Kamferol-3- <i>O</i> -pentozid	419	287	Pozitivan
Kamferol-3- <i>O</i> -heksozid	449	287	Pozitivan
Kamferol pentozil- heksozid	581	287	Pozitivan
Kamferol ramnozil- heksozid	595	287	Pozitivan

Kamferol-3- <i>O</i> -soforozid-7- <i>O</i> -ramnozid	757	287	Pozitivan
Miricetin	319	273	Pozitivan
Miricetin-3- <i>O</i> -glukozid	481	319	Pozitivan
Miricetin-3- <i>O</i> -galaktozid	481	319	Pozitivan
Miricetin-3- <i>O</i> -ramnozid	465	319	Pozitivan
Miricetin-3- <i>O</i> -rutinozid	627	319	Pozitivan
Miricetin-3- <i>O</i> -glukuronid	495	319	Pozitivan
Miricetin-3- <i>O</i> -arabinozid	463	331	Pozitivan
Rutin	611	465; 303	Pozitivan
Izoramnetin	317	285	Pozitivan
Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid	479	317	Pozitivan
Izoramnetin-3,7- <i>O</i> -diheksozid	641	317	Pozitivan
Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid	625	317	Pozitivan
Izoramnetin-3- <i>O</i> -ramnozid	463	317	Pozitivan
Izoramnetin-3- <i>O</i> -sinapoglukozid-glukozid-7- <i>O</i> -ramnozid	993	847	Pozitivan
Izoramnetin-3- <i>O</i> -soforozid-7- <i>O</i> -ramnozid	787	463	Pozitivan
Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid-7- <i>O</i> -glukozid	787	625	Pozitivan
<i>Flavoni</i>			
Apigenin	271	153	Pozitivan
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	433	271	Pozitivan
Apigenin-3- <i>O</i> -pentozid	403	271	Pozitivan
Apigenin-7- <i>O</i> -rutinozid	579,5	271	Pozitivan
Luteolin	287	153	Pozitivan
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	449,4	287	Pozitivan
Luteolin-7- <i>O</i> -rutinozid	595,5	287	Pozitivan
<i>Flavanoli</i>			
Epikatehin	291	139	Pozitivan

Katehin	291	139; 165	Pozitivan
Epigalokatehin galat	459	289; 139	Pozitivan
Epikatehin galat	442,9	273; 139	Pozitivan
Galokatehin	305	225	Negativan
Procijanidin B2	579	291	Pozitivan
<i>Flavanoni</i>			
Hesperidin	609,3	301,1	Negativan
<i>Lignani</i>			
Karnozinska kiselina	331	287	Negativan
Karnozol	329	285	Negativan
Metil karnozat	345	301	Negativan
Mediorezinol	387	207	Negativan
Epirozmanol	345	283	Negativan
Salvigenin	329	295,8	Pozitivan
<i>Antocijani</i>			
Delfinidin-3- <i>O</i> -pentozid	435	303	Pozitivan
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	465	303	Pozitivan
Delfinidin-3- <i>O</i> -arabinozid	435	303	Pozitivan
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	463	303	Pozitivan
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	493	331	Pozitivan
Petunidin-3- <i>O</i> -pentozid	449	317	Pozitivan
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	479	317	Pozitivan
Petunidin-3- <i>O</i> -arabinozid	449	317	Pozitivan
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	449	287	Pozitivan
<b>Fenolne kiseline</b>	<b>Prekursor ion (<i>m/z</i>)</b>	<b>Produkt ion (<i>m/z</i>)</b>	<b>Polaritet</b>
<i>Hidroksibenzojeve kiseline</i>			
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	137	93	Negativan
Galna kiselina	169	125	Negativan
Vanilinska kiselina	169,1	125,1	Pozitivan
Protokatehinska kiselina	153	109	Negativan
Digaloil kinična kiselina	495	343; 169	Negativan

Trigaloil kinična kiselina	647	495	Negativan
Monogaloil glukoza	331	169	Negativan
5- <i>O</i> -galoil kinična kiselina	343	191; 169; 125	Negativan
3- <i>O</i> -ferulil kinična kiselina	367	193	Negativan
<i>Hidroksicimetne kiseline</i>			
Kava kiselina	179	135	Negativan
Heksozid kava kiseline	341	179	Negativan
Ferulinska kiselina	193	178; 134	Negativan
Klorogenska kiselina	353	191	Negativan
<i>p</i> -kumarinska kiselina	163	119	Negativan
Ružmarinska kiselina	359,1	161,1	Negativan
Sagerinska kiselina	719,6	359	Negativan
Salvianolna kiselina	717	359	Negativan

#### 3.5.4. Kvantifikacija fenolnih spojeva

Kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva u uzorcima ljekovitih biljaka izračunata je prema baždarnim jednadžbama standardnih spojeva (tablica 5). Standardi polifenola za izradu kalibracijskih krivulja otopljeni su u metanolu u koncentraciji od 100 mg mL<sup>-1</sup>, a točke kalibracije bile su u rasponu od 0,10 do 50 mg mL<sup>-1</sup>.

Tablica 5. Baždarne jednadžbe standardnih spojeva

<b>Spoj</b>	<b>Baždarna krivulja</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	y= 1580 x	0,99
Kamferol-3- <i>O</i> -rutinozid	y= 217,43 x	0,98
Kava kiselina	y= 1282 x	0,99
Epikatehin	y= 221,99 x	0,97
Ferulinska kiselina	y= 44,403 x	0,99
Galna kiselina	y= 203,67 x	0,99
Klorogenska kiselina	y= 3410,5 x	0,99
<i>p</i> -kumarinska kiselina	y= 198,3 x	0,99
Katehin	y= 5477,2 x	0,98
Epigalokatehin galat	y= 355,6 x	0,98

Rutin	y=	153,45	x	0,99
Epikatehin galat	y=	218,67	x	0,99
Procijanidin B2	y=	523,87	x	0,99
Miricetin	y=	90,266	x	0,99
Apigenin	y=	198,43	x	0,99
Luteolin	y=	494,98	x	0,98
Kinična kiselina	y=	1409,6	x	0,99
Vanilinska kiselina	y=	153,43	x	0,98
Ružmarinska kiselina	y=	2022,5	x	0,97
Delfinidin klorid	y=	4727,8	x	0,98

Kvercetin i njegovi derivati, kao i izoramnetin i njegovi derivati te salvigenin izračunati su kao ekvivalenti kvercetin-3-*O*-glukozida, dok su kamferol i njegovi derivati kvantificirani pomoću baždarnе krivulje za kamferol-3-*O*-rutinozid. Nadalje, derivati miricetina izračunati su kao ekvivalenti miricetina, derivati apigenina kao ekvivalenti apigenina, a derivati luteolina kao ekvivalenti luteolina. Kao ekvivalenti ružmarinske kiseline izračunati su: sagerinska kiselina, salvianolna kiselina, mediorezinol, metil karnozat, epirozmanol, karnozinska kiselina i karnozol. Hesperidin kvantificiran je pomoću baždarnе krivulje za epikatehin galat, heksozid kava kiseline izračunat je kao ekvivalent kava kiseline te galokatehin kao ekvivalent katehina. Kao ekvivalenti galne kiseline izračunati su spojevi: protokatehinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, monogaloil glukoza, digaloil kinična kiselina, trigaloil kinična kiselina i 5-*O*-galoil kinična kiselina. Spoj 3-*O*-ferulil kinična kiselina izračunat je kao ekvivalent ferulinske kiseline. Svi antocijani izračunati su kao ekvivalenti delfinidin klorida.

### 3.6. ODEĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

#### 3.6.1. Kemikalije

- Standard Trolox 1 mM (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonskilna kiselina) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka)

Priprema: Odvaže se 0,025 g Trolox-a te otopi u metanolu i nadopuni metanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od 1 mM otopine Trolox-a pripreme se razrjeđenja u koncentracijama 10,74; 21,48; 42,95 i 85,9  $\mu$ M koja se koriste za izradu baždarnog pravca.

- Metanol, 100 %-tni (Lach-ner, Neratovice, Češka)

- 0,5 mM otopina DPPH (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)  
Priprema: 0,02 g DPPH otopi se u odmjernej tikvici od 100 mL s metanolom, te se tikvica nadopuni do oznake.

### 3.6.2. Aparatura

- Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Firenca, Italija)
- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Alès, Francuska)

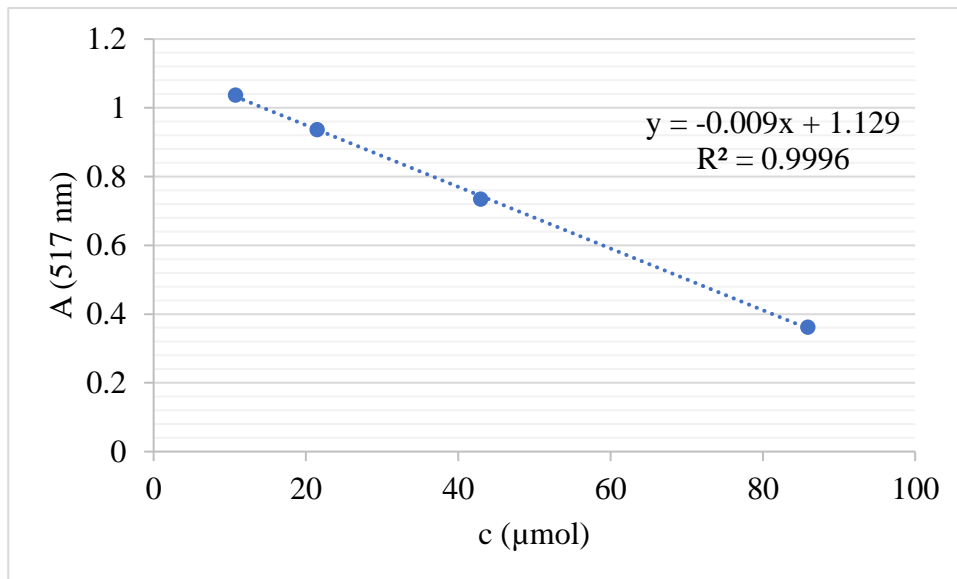
### 3.6.3. Pribor

- Plastične lađice za vaganje
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene čaše
- Automatska mikropipeta volumena 100 – 1000  $\mu$ L
- Odmjerne tikvice volumena 50 mL i 100 mL
- Staklena kiveta

### 3.6.4. Postupak određivanja

U staklenu epruvetu se otpiperira 1 mL ekstrakta, 1 mL 100 %-tnog metanola te 0,5 mL 0,5 mM otopine DPPH. Pripremljene otopine čuvaju se 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu. Postupak se ponovi za sve svaki pojedini ekstrakt, frakcija 1-3. Kvantifikacija se vrši na temelju jednadžbe baždarnog pravca Trolox-a pomoću računala u programu Microsoft Excel (slika 11) s vrijednostima koncentracije Trolox-a ( $\mu$ mol) na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Iz pripadajuće jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost uzoraka određena DPPH metodom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja kao  $\mu$ mol TE (Trolox ekvivalenta) na 100 g suhe tvari uzorka.





Slika 11. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti

gdje je:

$y$  = apsorbancija uzorka pri 517 nm

$x$  = ekvivalent Trolox-a (μmol)

$R^2$  = koeficijent determinacije

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome istraživanju ispitivana je učinkovitost uzastopne UAE za izolaciju biološki aktivnih spojeva pigmentata i fenola iz osušenog ljekovitog i aromatskog bilja (lišće kadulje i timijana, lišće lovora i tršlje, lišće i bobice mirte, bobice pasjeg trna te mahune rogača) uz upotrebu tri različita otapala različite polarnosti (heksan, 80 %-tni aceton i 96 %-tni etanol). U frakcijama ekstrakata navedenih biljaka provedeno je kromatografsko određivanje karotenoida i klorofila primjenom HPLC-UV-VIS/DAD metode, dok je sastav polifenolnih spojeva određen primjenom UPLC-MS/MS metode.

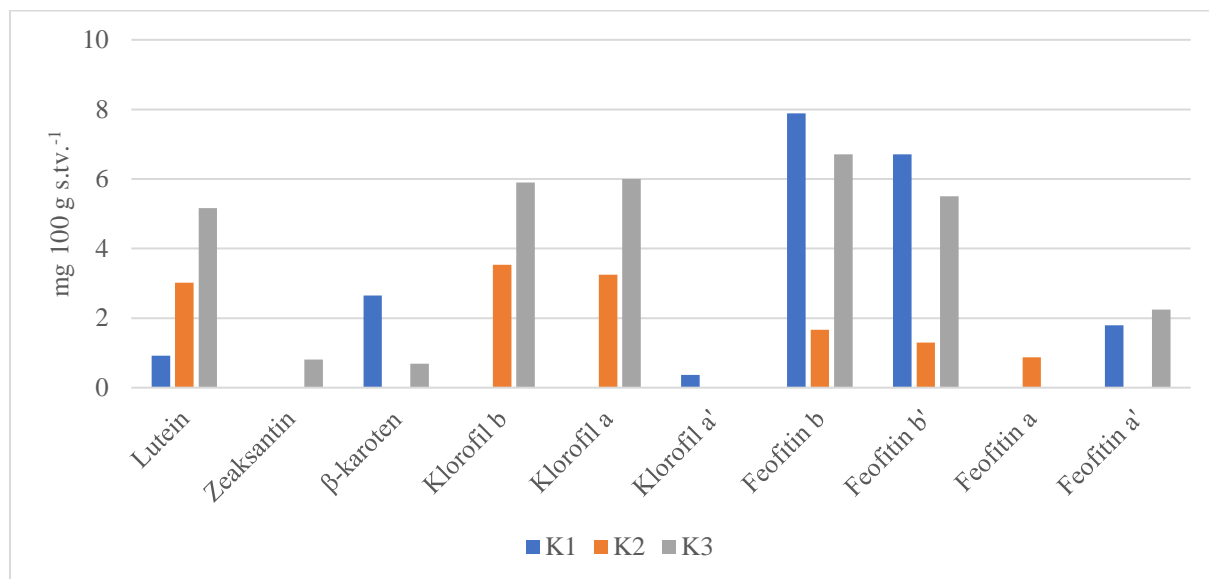
U ekstraktima biljaka frakcije 1 (otapalo heksan), frakcije 2 (otapalo 80 %-tni aceton) i frakcije 3 (otapalo 96 %-tni etanol) također je utvrđena antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH metode.

Maseni udjeli identificiranih i kvantificiranih karotenoida i klorofila (slike 12, 14, 16, 18, 20, 23), kao i skupina polifenolnih spojeva (slike 13, 15, 17, 19, 21, 22, 24, 25) izraženi su kao mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> uzorka. Antioksidacijska aktivnost prikazana je kao  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$  uzorka (slika 28). Prikazani su i ukupni maseni udjeli karotenoida i klorofila (slika 26) te polifenolnih spojeva (slika 27) svakog uzorka.

Dodatno, u prilogu su prikazani maseni udjeli svih identificiranih polifenolnih spojeva UPLC-MS/MS analizom za frakcije 1-3 svake analizirane biljke (tablice P1-P4).

#### 4.1. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LJEKOVITIH I AROMATSKIH BILJAKA

##### 4.1.1. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća kadulje



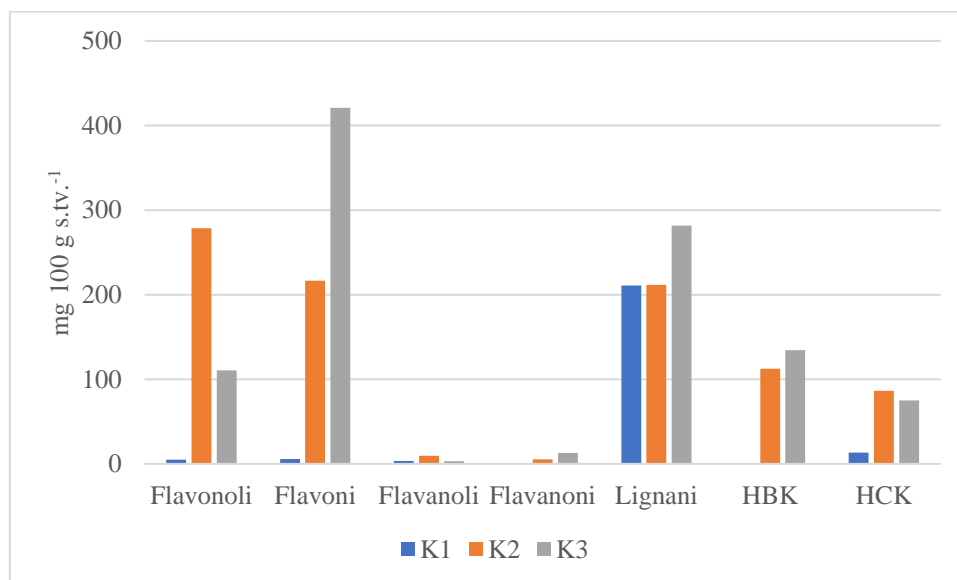
Slika 12. Maseni udjeli karotenoida i klorofila u ekstraktima lišća kadulje. K1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; K2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; K3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Na slici 12 prikazani su rezultati masenih udjela karotenoida i klorofila ekstrakata lišća kadulje u heksanskoj, acetonskoj i etanolnoj frakciji (frakcije 1-3). Ukupno je ekstrahirano 13,24 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> karotenoida u sve tri frakcije, od čega je 68,7 % bio lutein. U heksanskoj frakciji 1 u najvišem udjelu je ekstrahirano β-karoten (2,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) dok je u frakcijama 2 i 3 zajedno ekstrahirano oko 8 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> luteina. U istraživanju Daly i sur. (2010) određeno je 1,07 mg 100 g<sup>-1</sup> β-karotena i ukupno 0,90 mg 100 g<sup>-1</sup> luteina i zeaxantina, dok je u svježem lišću kadulje u istraživanju Murkovic i sur. (2000) određeno 2,78 mg 100 g<sup>-1</sup> β-karotena te 6,35 mg 100 g<sup>-1</sup> luteina i zeaxantina.

U sve tri frakcije ekstrakata kadulje ukupno je ekstrahirano 53,71 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> klorofila, što je znatno više u odnosu na maseni udio ekstrahiranih karotenoida. Omjer karotenoida i klorofila bio je 0,25. Veća zastupljenost klorofila očekivana je zbog izrazite zelene boje lišća kadulje. Najzastupljeniji klorofili su bili feofitin *b* i *b'*, koji čine 55,4 % ukupnog masenog udjela ekstrahiranih klorofila. Moguće je da je utjecaj sušenja i temperature ekstrakcije doveo do degradacije i pretvorbe klorofila u feofitine što dovodi do promjene boje (Samide i Tutunaru, 2017; Weemaes i sur., 1999). Najviši udio klorofila *a* ekstrahirano je u etanolnoj frakciji 3 lišća kadulje i iznosi 6,00 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> (slika 12), što je u skladu s rezultatima u istraživanju Murillo Amador i sur. (2014), gdje je maseni udio klorofila *a* iznosio 5,81 mg 100 g<sup>-1</sup>. Maseni

udio klorofila *b* iznosio je 1,91 mg 100 g<sup>-1</sup>, što je manje nego u acetonskoj frakciji 2 (3,53 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i etanolnoj frakciji 3 (5,90 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Maseni udjeli klorofila *a* i *b* su u znatno višim udjelima određeni u istraživanjima Martins i sur. (2016) te Miladinović i sur. (2015).

#### 4.1.2. Fenolni spojevi u ekstraktima lišća kadulje



Slika 13. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima lišća kadulje. K1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; K2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; K3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

Raspodjela polifenola prema skupinama za frakcije 1-3 lišća kadulje prikazana je na slici 13. Od ukupnog udjela ekstrahiranih polifenolnih spojeva (mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u sve tri frakcije, najzastupljeniji su bili lignani (704,24 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Sve tri frakcije sadržavale su više od 200 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> polifenolnih spojeva iz skupine lignana, a najviše etanolna frakcija 3 (281,76 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Najzastupljeniji lignan određen u ekstraktima kadulje je karnozinska kiselina, čiji je maseni udio bio u rasponu od 155,75 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> do 197,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, najmanji u acetonskoj frakciji 2, a najveći u frakciji 1. Osim karnozinske kiseline, etanolna frakcija 3 je sadržavala znatan udio metil karnozata (102,64 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P1). U istraživanju Velamuri i sur. (2020) karnozinska kiselina je određena u nižem udjelu u odnosu na ovo istraživanje (55,52 mg 100 g<sup>-1</sup>).

Najzastupljenije skupine polifenola u osušenim listovima kadulje nakon lignana su bili flavoni (642,82 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), potom flavonoli (394,15 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksibenzojeve

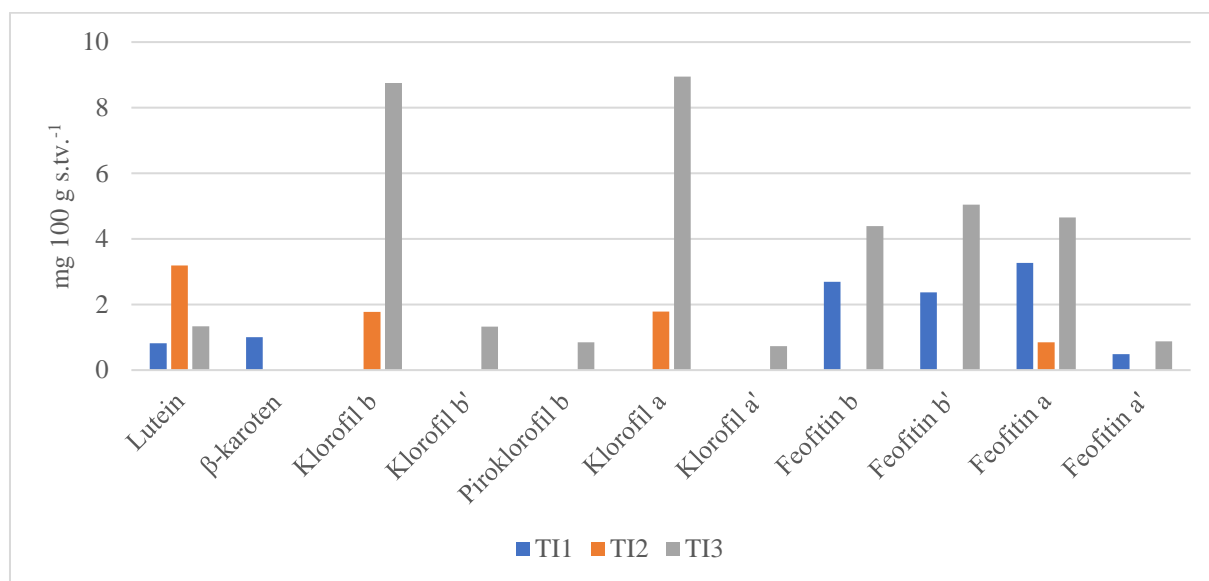
kiseline (246,85 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u sve tri frakcije zajedno. U heksanskoj frakciji 1 ove skupine bile su zastupljene u manjoj mjeri, no u frakcijama 2 i 3 detektirani su znatni udjeli (slika 13), što je i očekivano. Veći maseni udjeli flavona identificirani su u frakciji 3 (420,76 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u odnosu na frakciju 2 (216,44 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 13). Prema drugim istraživanjima flavoni su također bili određeni u znatnim udjelima u ekstraktima kadulje (Velamuri i sur., 2020; Pereira i sur., 2018; Dent i sur., 2017; Dent i sur., 2015). U istraživanju Dent i sur. (2015) masena koncentracija luteolin i apigenin glikozida iznosila je 1693,57 mg 100 g<sup>-1</sup> nakon UAE provedene 30 min pri 60 °C s 30 %-tnim etanolom kao otapalom, što je više nego u ovom istraživanju. U analiziranim uzorcima, najzastupljeniji flavon u frakciji 2 bio je luteolin-7-*O*-rutinozid (127,59 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a u frakciji 3 luteolin-7-*O*-glukozid (mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P1).

S druge strane, viši udjeli flavonola određeni su u frakciji 2 (278,76 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u odnosu na frakciju 3 (110,49 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), iako flavonoli nisu primarni polifenolni spojevi u kadulji (Pereira i sur., 2018; Dent i sur., 2017; Dent i sur., 2015). Kamferol-3-*O*-rutinozid najzastupljeniji je flavonol u frakciji 2 (266,94 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i frakciji 3 (91,92 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), dok u frakciji 1 nije detektiran (tablica P1).

Od fenolnih kiselina, detektirano je više hidroksibenzojevih kiselina u frakciji 3 (134,55 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u usporedbi s njihovim udjelima u frakciji 2 (112,31 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 13). Najzastupljenija je bila *p*-hidroksibenzojeva kiselina (tablica P1). Od ukupnog udjela hidroksicimetnih kiselina u frakciji 2 (86,24 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i u frakciji 3 (74,82 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 13) najzastupljenije su bile ružmarinska (32,45 i 26,18 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i ferulinska kiselina (25,76 i 23,86 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P1). U usporedbi s drugim istraživanjima ružmarinska kiselina je određena u znatno nižim koncentracijama kao i derivati kava, sagerinske i salvianolne kiseline (Velamuri i sur., 2020; Pereira i sur., 2018; Dent i sur., 2017; Dent i sur., 2015).

U frakciji s 96 %-tnim etanolom kao otapalom ekstrahirano je više ukupnih polifenola (1038,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).

#### 4.1.3. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća timijana

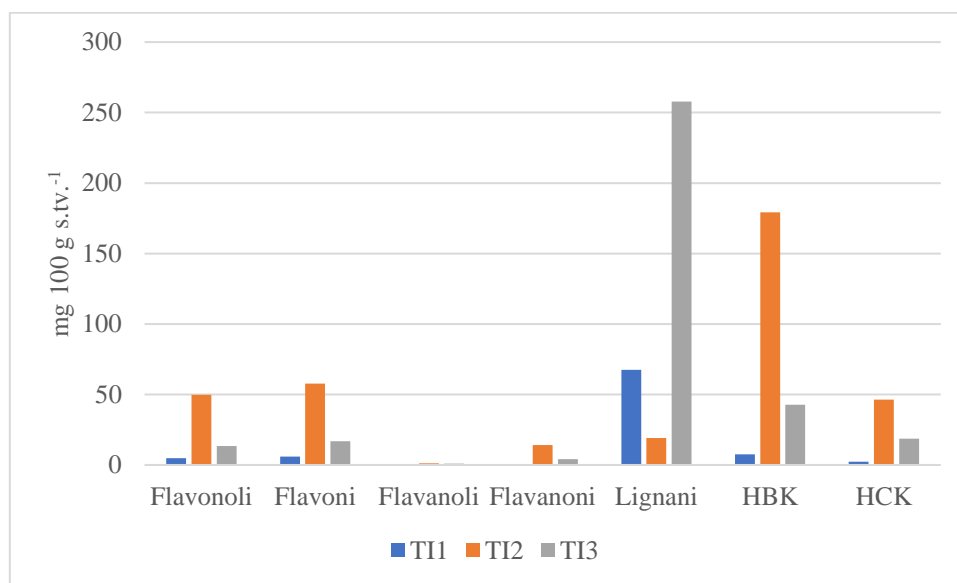


Slika 14. Maseni udio karotenoida i klorofila u ekstraktima lišća timijana. TI1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; TI2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; TI3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Maseni udjeli ekstrahiranih karotenoida i klorofila ekstrakata lišća timijana u frakcijama 1-3 prikazani su na slici 14. Ukupno je ekstrahirano 6,36 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> karotenoida, a lutein je bio najzastupljeniji karotenoid (84,18 %). Najviši maseni udio karotenoida je sadržavala acetonska frakcija 2, gdje je udio luteina iznosio 3,19 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>. Jedino je u frakciji 1 identificiran β-karoten (1,01 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 14). Prema istraživanju El-Qudah (2014) u acetonskom ekstraktu lutein je bio najzastupljeniji spoj, ali udio luteina je bio znatno niži nego u ovom istraživanju (0,63 mg 100 g<sup>-1</sup>). Također u manjim udjelima su određeni i zeaksantin i β-karoten.

Za razliku od karotenoida, klorofila je ekstrahirano znatno više (48,79 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te je omjer karotenoida i klorofila bio 0,13. Etanolna frakcija 3 ističe se najvišim udjelom klorofila od kojih najviše klorofila *a* (8,94 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), klorofila *b* (8,76 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te feofitina *b'* (5,04 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), feofitina *b* (4,39 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i feofitina *a* (4,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 14). Omjer klorofila *a* i klorofila *b* u analiziranim ekstraktima timijana je u skladu s literaturnim podacima, iako su udjeli klorofila *a* i klorofila *b* bili niži u ovom istraživanju (El-Qudah, 2014; Sharafzadeh i Alizadeh, 2011). Vjerojatno je zbog toplinske obrade ekstrakata došlo do degradacije klorofila *a* i klorofila *b* zbog čega je i identificiran velik broj feofitina (Samide i Tutunaru, 2017; Weemaes i sur., 1999).

#### 4.1.4. Fenolni spojevi u ekstraktima lišća timijana



Slika 15. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima lišća timijana. TI1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; TI2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; TI3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

Zastupljenost pojedinih polifenolnih skupina ekstrakata lišća timijana u frakcijama 1-3 prikazana je na slici 15. Od ukupno ekstrahiranih polifenolnih spojeva (810,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), najzastupljeniji su bili lignani (344,39 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksibenzojeve kiseline (229,50 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).

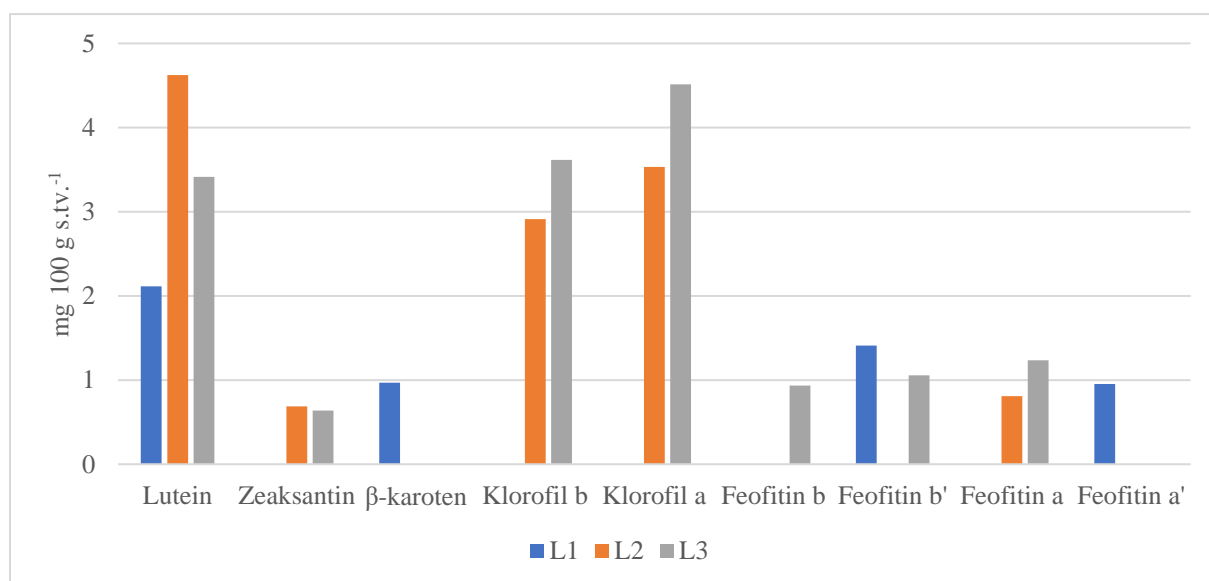
Maseni udjeli svih polifenolnih skupina su bili najniži u frakciji 1 osim lignana (67,53 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), čiji je maseni udio najviši u etanolnoj frakciji 3 (257,79 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Najzastupljeniji lignani u sve tri frakcije su karnozinska kiselina (7,04-117,98 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), karnozol (2,63-131,20 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te metil karnozat (4,74-18,16 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P1).

U odnosu na frakciju 1 i 3, frakcija 2 sadržavala je najviše hidroksibenzojevih kiselina (179,30 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), flavona (57,77 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), flavonola (49,88 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksicimetnih kiselina (46,33 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 15). Iz skupine hidroksibenzojevih kiselina najzastupljenija je bila *p*-hidroksibenzojeva kiselina (162,00 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), iz skupine flavona luteolin-7-*O*-glukozid (25,82 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i apigenin-7-*O*-glukozid (11,49 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), iz skupine flavonola rutin (25,33 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i kamferol-3-*O*-rutinozid (19,39 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te ružmarinska kiselina (17,66 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) iz skupine hidroksicimetnih kiselina (tablica P1). U istraživanju Köksal i sur. (2016) iz skupine

hidroksibenzojevih kiselina u etanolnom ekstraktu timijana identificirana je galna kiselina u sličnom udjelu (180,12 mg 100 g<sup>-1</sup>).

Prema literaturnim podacima najzastupljeniji fenolni spojevi u timijanu su ružmarinska kiselina, metil rosmarinat, kava kiselina te derivati apigenina, luteolina i kvercetina (Nieto, 2020; Taghouti i sur., 2020; Kuete, 2017; Pacifico i sur., 2016; Roby i sur., 2013; Fecka i Turek, 2008).

#### 4.1.5. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća lovora



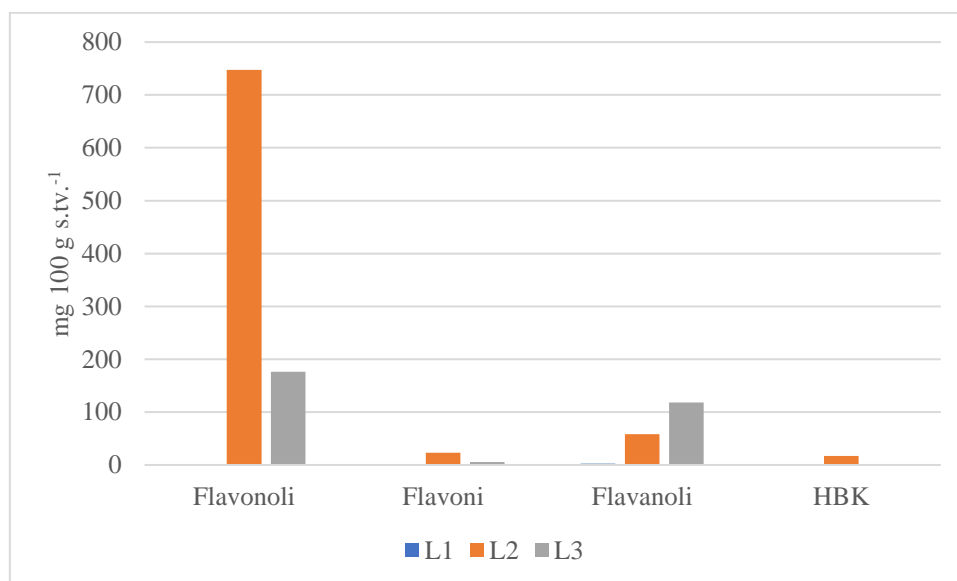
Slika 16. Maseni udjeli karotenoida i klorofila u ekstraktima lišća lovora. L1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; L2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; L3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Rezultati masenih udjela pojedinih karotenoida i klorofila u frakcijama 1-3 lišća lovora prikazani su na slici 16. Najzastupljeniji karotenoid bio je lutein (10,15 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), dok je ukupno u sve tri frakcije ekstrahirano 12,44 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> karotenoida, što je skoro dvostruko više nego u istraživanjima Berim i sur. (2015) (6,88 mg 100 g<sup>-1</sup>). Najviše karotenoida određeno je u acetonskoj frakciji 2.

U odnosu na karotenoide, ukupno u sve tri frakcije ekstrahirano je više klorofila (20,97 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a najzastupljeniji su bili klorofil *a* (8,04 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i klorofil *b* (6,53 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Etanolna frakcija 3 sadržavala je najviše udjele klorofila *a* i *b* (4,51 i 3,62 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) odnosno ukupnih klorofila. Maseni udjeli feofitina pretežno su određeni u frakciji 1 i 3 u nižim udjelima (slika 16).



#### 4.1.6. Fenolni spojevi u ekstraktima lišća lovora



Slika 17. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima lišća lovora. L1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; L2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; L3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline

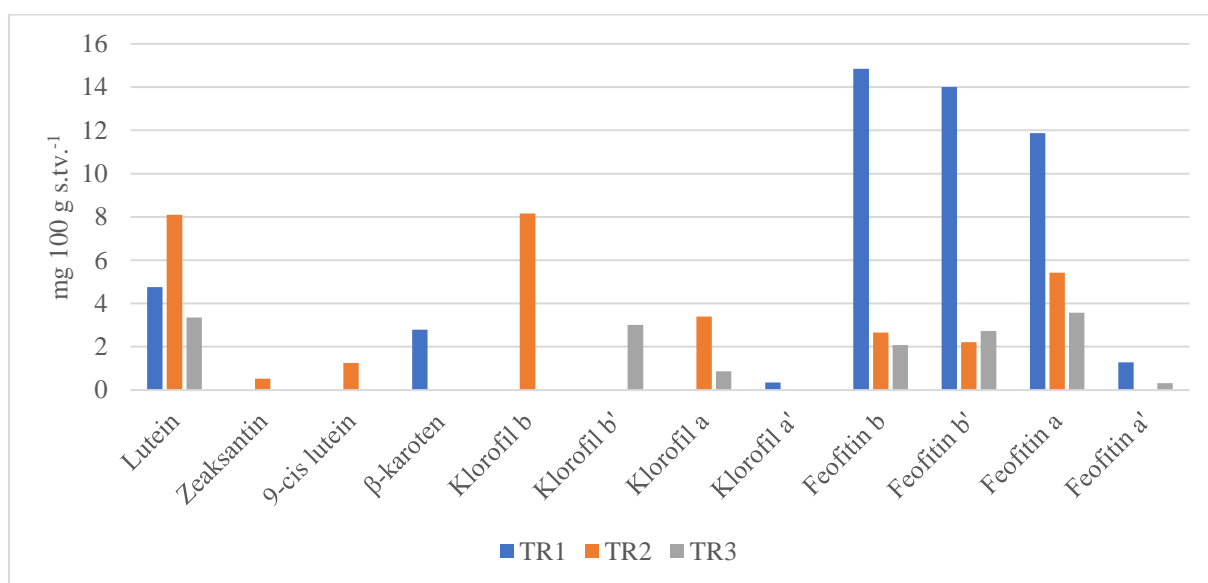
Od ukupnog masenog udjela ekstrahiranih polifenolnih spojeva (1151,00 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u sve tri frakcije, najzastupljeniji su bili flavonoli (925,20 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), dok su u značajno nižim udjelima određeni flavanoli (179,60 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), flavoni (28,83 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksibenzojeve kiseline (17,36 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Najviši udio navedenih polifenolnih skupina detektiran je u frakcijama 2 i 3 (slika 17).

Flavonoli su bili zastupljeniji u acetonskoj frakciji 2 (747,53 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), nego u etanolnoj frakciji 3 (176,28 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 17). Najzastupljeniji flavonoli u listu lovora bili su kvercetin-3-*O*-glukozid i kamferol-3-*O*-heksozid, što je u skladu s literaturnim podacima (Pacifico i sur., 2014; Dall'Acqua i sur., 2009). U acetonskoj frakciji 2, maseni udio kvercetin-3-*O*-glukozida iznosio je 277,87 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, a kamferol-3-*O*-heksozida 209,80 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, dok su u etanolnoj frakciji 3 njihovi udjeli bili niži gotovo četverostruko (73,92 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), odnosno šesterostruko (36,71 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P2). U istraživanju Stefanove i sur. (2020) maseni udio glikozida kamferola bio je viši od masenog udjela glikozida kvercetina, što je vjerojatno utjecaj sortimenta i okolišnih uvjeta. Tako na primjer, uzorci lišća lovora iz Grčke i Gruzije sadržavali su 198,13 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, odnosno 68,81 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> glikozida kamferola, a glikozidi kvercetina određeni su u udjelima od 4,23 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> i 4,49 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> uzorka lišća lovora.

Suprotno udjelu flavonola, udio flavanola je viši u etanolnoj frakciji 3 (118,39 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), nego u acetonskoj frakciji 2 (58,46 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 17). Od flavanola, većinom je bio zastupljen epikatehin (tablica P2). Samo su u acetonskoj frakciji 2 detektirane hidroksibenzojeve kiseline u ukupnom udjelu od 17,36 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> i to protokatehinska (11,36 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i *p*-hidroksibenzjeva kiselina (6,01 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 17, tablica P2).

U istraživanju Stefanove i sur. (2020) u lišću lovora iz Grčke i Gruzije hidroksibenzojeve kiseline su bile određene u većim udjelima u odnosu na ovo istraživanje.

#### 4.1.7. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća tršlje



Slika 18. Maseni udjeli karotenoida i klorofila u ekstraktima lišća tršlje. TR1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; TR2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; TR3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

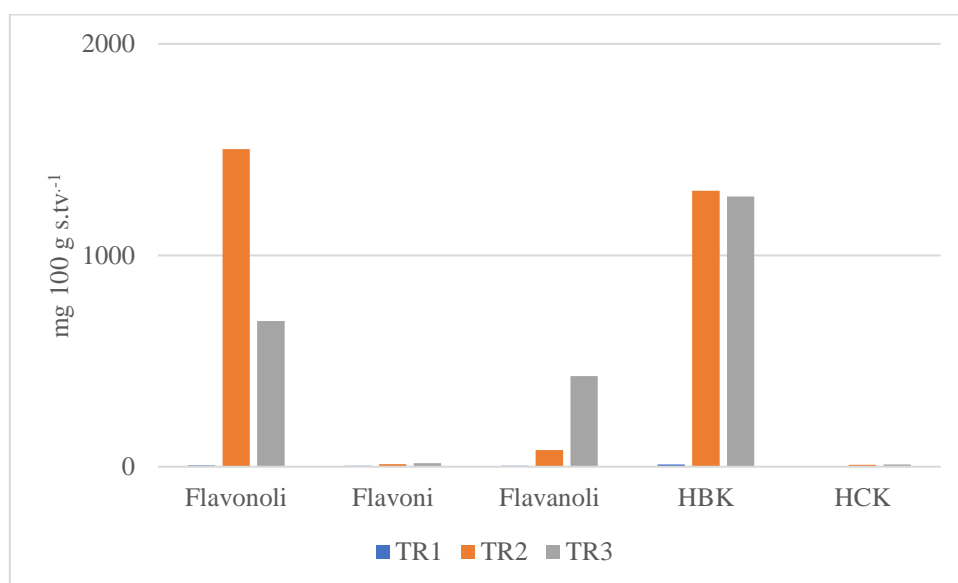
Identificirani karotenoidi i klorofili u frakcijama 1-3 lišća tršlje prikazani su na slici 18. Ekstrahirano je ukupno 20,79 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> karotenoida, od čega 78,0 % luteina. U acetonskoj frakciji 2 najviše je luteina (8,11 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), dok je jedino u frakciji 1 identificirano β-karotena u udjelu od 2,79 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> uzorka lišća tršlje. Identificirani karotenoidi u ekstraktima lišća tršlje su u skladu s literaturnim podacima (Said i sur., 2013; Munné-Bosch i Peñuelas, 2003).

U odnosu na karotenoide više se ekstrahiralo klorofila (76,81 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te je omjer karotenoida i klorofila iznosio 0,27, što je u skladu s rezultatima istraživanja Saida i sur. (2013).

Najzastupljeniji klorofili su bili feofitin *b*, *b'* i *a*, čiji su maseni udjeli u frakciji 1 bili viši od 10 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> lišća tršlje (slika 18).

Klorofil *b* (8,16 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) je identificiran samo u frakciji 2 u kojoj je također u najvećem udjelu određen i klorofil *a* (3,40 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), u odnosu na ostale dvije frakcije (slika 18). Prema istraživanju Said i sur. (2013) u ekstraktu tršlje određen je viši maseni udio klorofila *b* nego klorofila *a*. Viši udjeli feofitina su određeni u analiziranim ekstraktima vjerojatno zbog razgradnje klorofila pri višim temperaturama ekstrakcije (Samide i Tutunaru, 2017; Weemaes i sur., 1999).

#### 4.1.8. Fenolni spojevi u ekstraktima lišća tršlje



Slika 19. Maseni udjeli identificiranih polifenola u ekstraktima lišća tršlje. TR1 – frakcija 1 ekstrahirana heskanom i otopljena u etil-acetatu; TR2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; TR3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

Ukupno je ekstrahirano 5356,29 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup> polifenolnih spojeva, od čega su najzastupljenije bile hidroksibenzojeve kiseline (2593,27 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a potom flavonoli (2198,61 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te flavanoli u nižim udjelima (511,99 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). U frakciji 1 identificirani su niži udjeli polifenolnih spojeva, dok hidroksicimetne kiseline nisu identificirane (slika 19).

Maseni udio flavonola najviši je u acetonskoj frakciji 2 (1502,74 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a u etanolnoj frakciji 3 (689,71 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) je niži više nego dvostruko (slika 19). Identificirano je 15 različitih flavonola, a najzastupljeniji su bili miricetin-3-*O*-glukuronid,

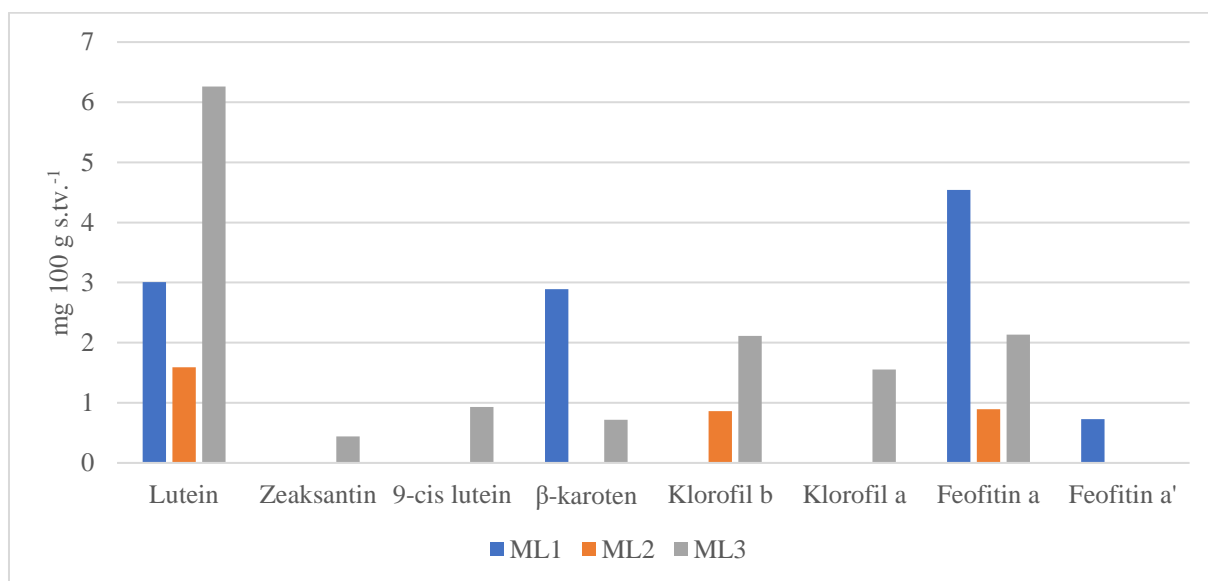
miricetin-3-*O*-ramnozid te kamferol-3-*O*-heksozid (tablica P2). Viši je maseni udio flavanola određen u frakciji 3 (429,03 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u usporedbi s u frakcijom 2 (78,70 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 19), a najzastupljeniji flavanoli su epikatehin i epigalokatehin galat (tablica P2).

Hidroksibenzojeve kiseline, kao i flavonoli, bile su zastupljenije u frakciji 2 (1304,67 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u usporedbi s frakcijom 3 (1278,36 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 19). U frakcijama 2 i 3 u najvišem udjelu je određena digaloil kinična kiselina (812,08, odnosno 605,95 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a nakon nje trigaloil kinična kiselina (225,46, odnosno 437,94 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P2). Prema rezultatima Gori i sur. (2020) od svih polifenola utvrđena je najveća zastupljenost derivata kinične kiseline. Također, i u istraživanju Garofulić i sur. (2020), digaloil kinična kiselina je bila najzastupljenija kiselina čiji maseni udio u etanolnom ekstraktu je bio u skladu s ovim istraživanjem.

Nakon derivata kinične kiseline, miricetin i derivati su bili najzastupljeniji spojevi u ukupnom udjelu polifenola, što je u skladu s rezultatima Gori i sur. (2020). U istraživanju Garofulić i sur. (2020) utvrđen je viši udio derivata miricetina u odnosu na derivate kinične kiseline. Također, u navedenom istraživanju identificirani su i flavanoli epikatehin i epigalokatehin galat, iako u znatno nižim udjelima u odnosu na rezultate za frakciju 3 u ovom istraživanju.

Općenito, u frakciji s 80 %-tnim acetonom ekstrahirano je najviše polifenolnih spojeva lista tršlje (2907,37 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), ali visok udio polifenola detektiran je i u etanolnoj frakciji (2424,17 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).

#### 4.1.9. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima lišća mirte

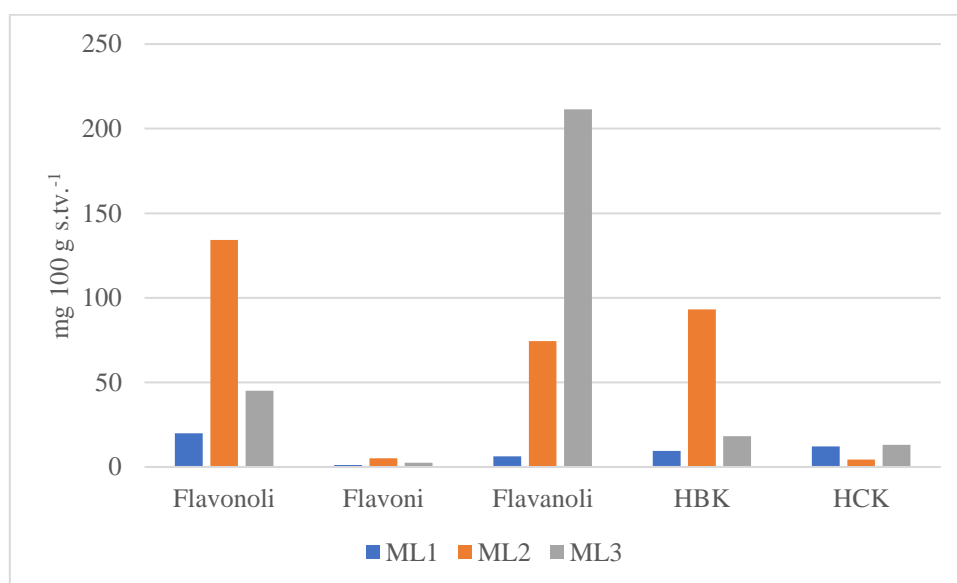


Slika 20. Maseni udjeli karotenoida i klorofila u ekstraktima lišća mirte. ML1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; ML2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; ML3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Slika 20 prikazuje masene udjele karotenoida i klorofila ekstrakata lišća mirte u frakcijama 1-3. Ukupni maseni udio ekstrahiranih karotenoida iznosi 15,84 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, a najzastupljeniji karotenoid je lutein (10,86 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Najviši udio luteina (6,26 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), odnosno ukupnih karotenoida, ekstrahirano je u etanolnoj frakciji 3. Najviše β-karotena (2,89 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) ekstrahirano je u heksanskoj frakciji 1.

U odnosu na karotenoide, iz lišća mirte ekstrahirano je manje klorofila (12,82 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Prema istraživanju Cioć i sur. (2017), u analiziranim listovima mirte bila je veća zastupljenost klorofila u odnosu na karotenoide. Od ukupnih klorofila u frakciji 1 (5,27 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), najzastupljeniji je bio feofitin *a* (4,54 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). U frakciji 3 određeno je dvostruko manje feofitina *a* (2,13 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), no frakcija 3 je dodatno sadržavala najviše klorofila *a* (1,55 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i klorofila *b* (2,11 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), u odnosu na heksansku i acetonsku frakciju, te posljedično i najviše ukupnih klorofila. Prema istraživanjima Cioć i sur. (2017) te Mendes i sur. (2001) lišće mirte sadržavalo je viši udio klorofila *a* u odnosu na klorofil *b*. U ovom istraživanju, u uzorcima je određen znatan udio feofitina *a* vjerojatno zbog veće degradacije klorofila *a*, a što je moguć uzrok nižeg udjela klorofila *a* u odnosu na klorofil *b*, čiji feofitini nisu identificirani (slika 20).

#### 4.1.10. Fenolni spojevi u ekstraktima lišća mirte



Slika 21. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima lišća mirte. ML1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; ML2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; ML3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

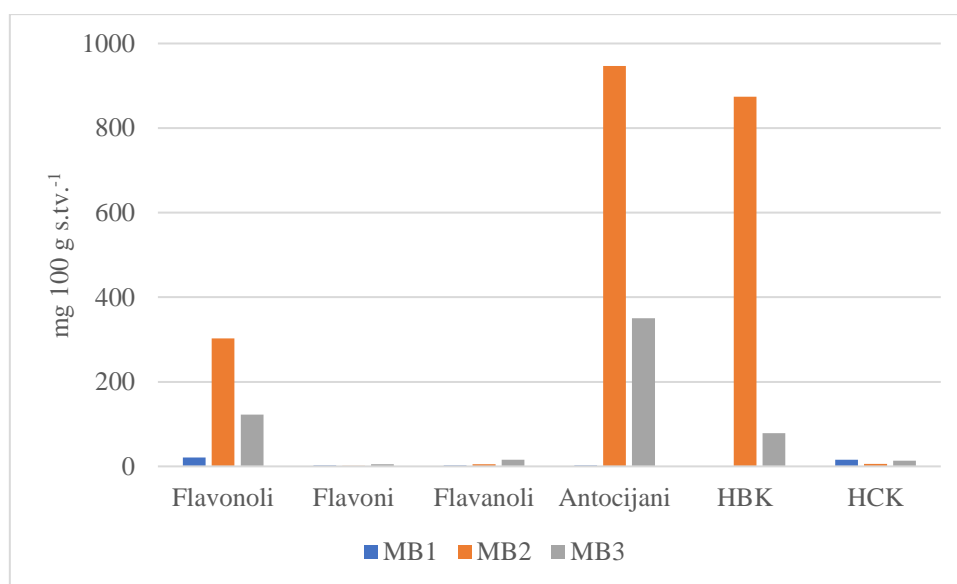
U ekstraktima lišća mirte ukupan udio ekstrahiranih polifenola bio je 650,53 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, a najviši udio sadržavala je acetonska frakcija 2 (311,27 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). U frakciji 2 najzastupljeniji su bili flavonoli (134,16 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), hidroksibenzojeve kiseline (93,08 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i flavoni (74,46 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). U frakciji 3 ekstrahiralo se gotovo trostruko više flavanola (211,40 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) u usporedbi s frakcijom 2 (slika 21).

U frakciji 2 od flavonola najzastupljeniji spoj je bio miricetin (105,49 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), od hidroksibenzojevih kiselina 5-*O*-galoil kinična kiselina (73,42 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a od flavanola epigalokatehin galat (64,52 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P3). Prema literaturnim podacima, miricetin i njegovi glikozidi su zastupljeni u znatnim udjelima u lišću mirte u odnosu na druge polifenolne skupine (Cioć i sur., 2017; Taamalli i sur., 2013). U istraživanju Cioć i sur. (2017) maseni udio miricetina nakon hidrolize lišća *in vitro* uzgojenih biljaka bio je znatno viši (670,69 ± 43,04 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), nego u ovom istraživanju. Također, Cioć i sur. (2017) su detektirali epigalokatehin galat, iako u nižim udjelima u odnosu na katehin i epigalokatehin. U istraživanju Dahmoune i sur. (2015) također su u lišću mirte detektirani flavonoli (glikozidi miricetina i kvercetina), epigalokatehin te galna, galoil kinična i digaloil kinična kiselina.

#### 4.1.11. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima bobica mirte

Primjenom HPLC-UV/VIS/DAD metode u frakcijama 1-3 ekstrakata bobica mirte nisu identificirani karotenoidi i klorofili vjerojatno zbog dominantnog sadržaja pigmenata antocijana (Tuberoso i sur., 2010).

#### 4.1.12. Fenolni spojevi u ekstraktima bobica mirte



Slika 22. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima bobica mirte. MB1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; MB2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; MB3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

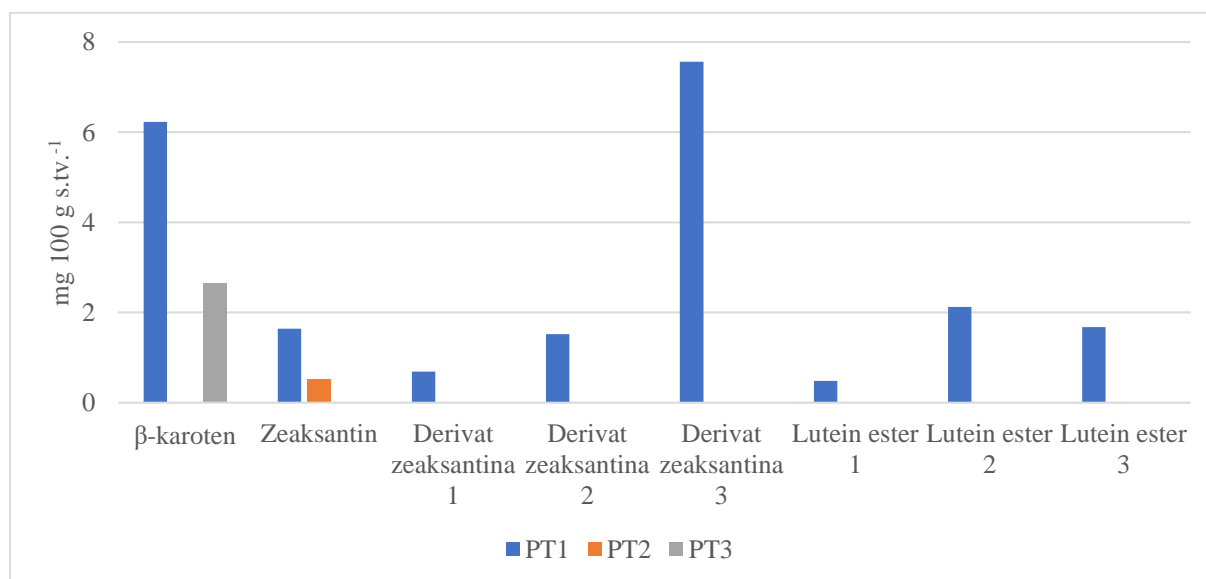
Na slici 22 prikazani su maseni udjeli polifenolnih skupina u frakcijama 1-3 bobica mirte. Od ukupnog udjela ekstrahiranih polifenolnih spojeva (2764,55 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), najzastupljeniji su antocijani (1298,89 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), hidroksibenzojeve kiseline (953,09 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te flavonoli (445,64 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). U heksanskoj frakciji 1, hidroksibenzojeve kiseline nisu identificirane, dok su ostale navedene polifenolne skupine identificirane u nižim udjelima. U acetonskoj frakciji 2 ekstrahiran je najviši udio polifenolnih spojeva (2136,73 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), najviše antocijana (947,13 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), hidroksibenzojevih kiselina (874,44 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te flavonola (302,83 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Maseni udio antocijana (349,95 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), hidroksibenzojevih kiselina (78,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te flavonola (122,14 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) je određen u nižim udjelima u frakciji 3 (slika 22).

U ekstraktima plodova mirte identificirano je 9 antocijana od kojih su najzastupljeniji bili: 3-*O*-glukozidi malvidina, petunidina i delphinidina, što je u skladu s istraživanjem Messaoud i

Boussaid (2011). U frakciji 2 su identificirani znatni udjeli delfinidin-3-*O*-pentozida i delfinidin-3-*O*-arabinozida (100 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P3).

Nadalje, u frakciji 2 od ukupnog udjela hidroksibenzojevih kiselina, najzastupljenije su bile 5-*O*-galoil kinična kiselina (551,93 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i digaloil kinična kiselina (309,33 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P3), što je u skladu s istraživanjem Yangui i sur. (2021). Od flavonola, u frakcijama 2 i 3 najviše je identificirano kvercetin-3-*O*-glukozida (175,94 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, odnosno 83,54 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P3). Prema literaturnim podacima glikozidi miricetina su bili najzastupljeniji spojevi iz skupine flavonola u bobicama mirte (Snoussi i sur., 2012; Tuberoso i sur., 2010; Barboni i sur., 2010).

#### 4.1.13. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima bobica pasjeg trna



Slika 23. Maseni udjeli karotenoida u ekstraktima bobica pasjeg trna. PT1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; PT2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; PT3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Ukupni maseni udio karotenoida u frakcijama 1-3 bobica pasjeg trna iznosio je 25,12 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, od čega najviše zeaksantina i njegovih derivata (11,42 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te β-karotena (8,89 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika 23).

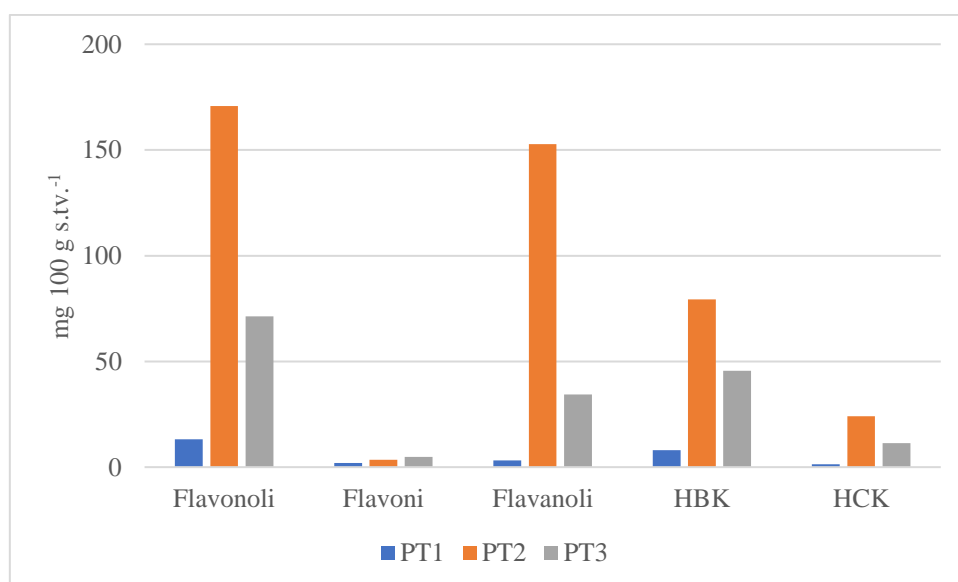
Frakcija 1 je sadržavala najviši maseni udio ukupnih karotenoida (87,3 %) u odnosu na frakciju 2 i 3 (slika 23), a najzastupljeniji karotenoidi su bili β-karoten (6,23 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i derivat zeaksantina (7,57 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), što je u skladu s literaturnim podacima (Ciesarová i sur., 2020; Pundir i sur., 2020).



U nižim udjelima su identificirani i esteri luteina ( $4,29 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ), što je u skladu s rezultatima istraživanja Pop i sur. (2014). Sastav i udio karotenoida znatno ovisi o sorti, uvjetima uzgoja, klimi i vremenu berbe (Ciesarová i sur., 2020). Na primjer, u istraživanju Andersson i sur. (2009) ukupni udio karotenoida u različitim sortama bobica pasjeg trna bio je u rasponu od  $1,5\text{--}18,5 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ , a u istraživanju Pop i sur. (2014) u rasponu od 53 do  $97 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$  uzorka.

Klorofili nisu identificirani u ekstraktima pasjeg trna, što je u skladu s literarnim podacima (Ciesarová i sur., 2020; Pundir i sur., 2020). Prema istraživanju Andersson i sur. (2009) koncentracija klorofila se smanjuje zrenjem bobica, a jedini identificiran klorofil je bio feofitin *a*.

#### 4.1.14. Fenolni spojevi u ekstraktima bobica pasjeg trna



Slika 24. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima bobica pasjeg trna. PT1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; PT2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; PT3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

Raspodjela polifenola prema skupinama u frakcijama 1-3 pasjeg trna prikazana je na slici 24. Ukupno je ekstrahirano  $625,84 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$  polifenolnih spojeva, od kojih najviše flavonola ( $255,33 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ), flavanola ( $190,30 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ) i hidroksibenzojevih kiselina ( $132,91 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ). U odnosu na frakciju 1 maseni udjeli svih skupina polifenolnih spojeva identificirani su u znatno višim udjelima u frakcijama 2 i 3. U acetonskoj frakciji 2, maseni udio flavonola iznosio je  $170,80 \text{ mg } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ , dok je u frakciji 3 udio

flavonola bio više nego dvostruko niži, a najzastupljeniji spojevi bili su rutin i izoramnetin-3-*O*-heksozid, odnosno kamferol i rutin (tablica P4). U ekstraktima pasjeg trna također su identificirani glikozidi kvercetina, kamferola i izoramnetina, što je u skladu s literaturnim podacima (Ciesarová i sur., 2020).

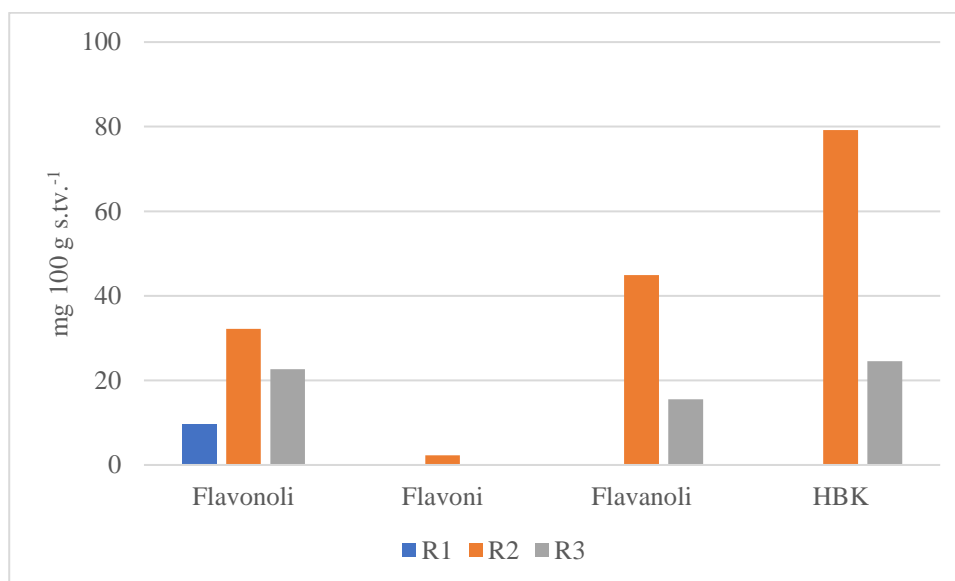
Najviši udio flavanola je ekstrahiran u acetonskoj frakciji 2, a zatim u etanolnoj frakciji 3 s epikatehinom kao najznačajnijim spojem (146,74 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>, odnosno 33,34 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P4). Prema istraživanju Suryakumar i Gupta (2011) epikatehin je prisutan u višim udjelima u listovima i zelenim bobicama pasjeg trna.

Maseni udio ukupnih hidroksibenzojevih kiselina bio je viši u frakciji 2 (79,38 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) za razliku od frakcije 3 (45,54 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a najzastupljenije su bile protokatehinska i vanilinska kiselina (tablica P4). Prema literaturnim podacima vanilinska i galna kiselina su bile najzastupljenije fenolne kiseline u bobicama pasjeg trna (Ciesarová i sur., 2020; Zadernowski i sur., 2005). Od flavonoida, u literaturi se ističe visok udio flavonola, dok lišće pasjeg trna sadrži više udjele flavanola i fenolnih kiselina u odnosu na bobice (Ciesarová i sur., 2020; Pundir i sur., 2020; Suryakumar i Gupta, 2011).

#### 4.1.15. Karotenoidi i klorofili u ekstraktima mahuna rogača

Primjenom HPLC-UV-VIS/DAD metode u frakcijama 1-3 analiziranih ekstrakata mahuna rogača nisu identificirani karotenoidi i klorofili, iako postoje literaturni podaci o prisutnosti karotenoida i klorofila u mahuni rogača (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2017; Hadi i sur., 2017).

#### 4.1.16. Fenolni spojevi u ekstraktima mahuna rogača



Slika 25. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima mahuna rogača. R1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; R2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; R3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu; HKB – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimetne kiseline

Od ukupnog udjela polifenolnih spojeva u frakcijama 1-3 mahuna rogača (230,96 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), najzastupljenije su bile hidroksibenzojeve kiseline (103,80 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te flavonoli (64,40 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i flavanoli (60,46 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Općenito, u acetonskoj frakciji 2 ekstrahirana je najviši udio polifenola mahuna rogača (slika 25). Prema istraživanju Benchikh i Louailèche (2014) za ekstrakciju fenolnih spojeva, odnosno flavonoida, najučinkovitije ekstrakcijsko otapalo bio je 70 %-tni aceton.

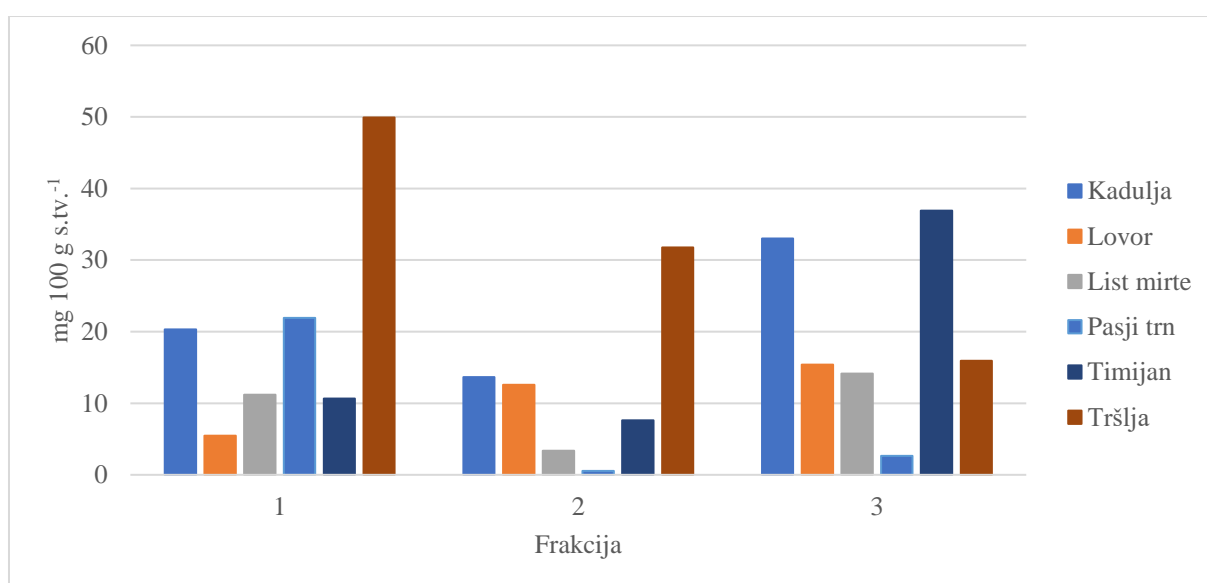
U heksanskoj frakciji 1 identificirani su samo flavonoli (9,57 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), dok su frakcije 2 i 3 uz flavonole (32,16, odnosno 22,67 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) sadržavale i flavanole (44,94 i 15,52 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te hidroksibenzojeve kiseline (79,23 i 24,57 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Najzastupljeniji flavonoli mahuna rogača su bili glikozidi miricetina (miricetin-3-*O*-ramnozid i -3-*O*-glukozid) i kvercitrin što je u skladu s literaturnim podacima (Alzoubi i sur., 2018; Hadi i sur., 2017; Rtibi i sur., 2017; Ydjedd i sur., 2017; Papagiannopoulos i sur., 2004).

Od flavanola, najviši maseni udio je ekstrahirana u frakciji 2 s epikatehinom kao najzastupljenijim spoj (33,83 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), što je u skladu s literaturnim podacima (Corsi i sur., 2002) (tablica P11). U frakciji 3 ekstrahirano je gotovo trostruko manje flavanola nego u frakciji 2 s epigalokatehin galatom u najvišem udjelu (6,26 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P4).

Od fenolnih kiselina, u frakcijama 2 i 3 jedina detektirana hidroksibenzojeva kiselina bila je galna kiselina, a viši udio je identificiran u acetonskoj frakciji 2 (79,23 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (tablica P4). Od ukupnog udjela polifenola, 44,94 % čini galna kiselina što je u skladu s istraživanjem Ydjedd i sur. (2017). I u istraživanju Papagiannopoulos i sur. (2004) galna kiselina je bila najzastupljeniji polifenolni spoj mahune rogača. U usporedbi s istraživanjem Corsi i sur. (2002) gdje se kao ekstrakcijsko otapalo koristila voda, u ovom istraživanju ekstrahirano je dvostruko više polifenola.

## 4.2. USPOREDBA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA MEDITERANSKOG BILJA

### 4.2.1. Sadržaj karotenoida i klorofila



Slika 26. Ukupni maseni udio karotenoida i klorofila analiziranih ekstrakata mediteranskog bilja u frakcijama 1-3. Frakcija 1 – ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; Frakcija 2 – ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; Frakcija 3 – ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

U uzorcima lišća kadulje, lovora, mirte i timijana najviši maseni udjeli karotenoida i klorofila određeni su u frakciji 3, odnosno ekstraktima uzoraka otopljenih u 96 %-tnom etanolu. U svim prethodno navedenim uzorcima mediteranskog bilja najniži maseni udjeli karotenoida i klorofila ekstrahirani su u frakciji 2, gdje je ekstrakcijsko otapalo bilo 80 %-tni aceton, osim u uzorku lista lovora gdje je najniži maseni udio određen u frakciji 1. S druge strane, u uzorku pasjeg trna, u frakciji 1 (uzorci ekstrahirani heksanom koji je otparen i ekstrakt otopljen u etil-acetatu) određen je najviši maseni udio ukupnih karotenoida i klorofila, dok su u ostale dvije frakcije udjeli znatno niži (0,53 i 2,66 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Za uzorak tršlje uočen je padajući trend

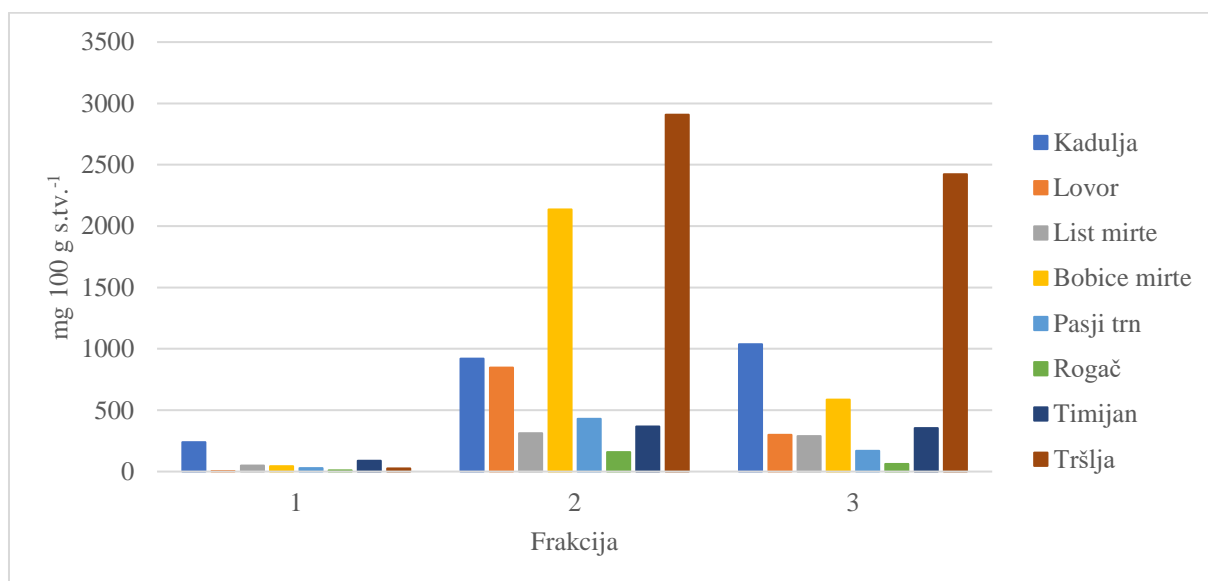
ekstrahiranih masenih udjela karotenoida i klorofila i to redom: frakcija 1 > frakcija 2 > frakcija 3 (slika 18). Razlike u ukupnom udjelu karotenoida i klorofila u pojedinim frakcijama vjerojatno su rezultat različitog sastava istih u analiziranom mediteranskom bilju zbog različitih morfoloških i botaničkih karakteristika. Klorofili su relativno polarni spojevi te je klorofil *b*, u odnosu na klorofil *a*, polarniji zbog prisustva aldehidne umjesto metilne skupine (Schoefs, 2002). Zbog svoje polarnosti, klorofili *a* i *b* nisu identificirani u frakcijama 1 analiziranih biljaka, već samo u frakcijama 2 i 3, od čega su u najpolarnijem otapalu, etanolu, identificirani u najvišim udjelima. U istraživanju Moracelli i sur. (2021) također se etanol pokazao kao najefikasnije otapalo za ekstrakciju klorofila.

Frakcije 1 lišća kadulje, mirte i timijana imaju više masene udjele ukupnih karotenoida i klorofila u odnosu na frakcije 2 istih biljaka moguće radi veće količine ekstrahiranog  $\beta$ -karotena i/ili feofitina. Feofitini su manje polarni od klorofila (Kusmita i sur., 2014). Nadalje, u frakciji 2 lišća kadulje i mirte određeni su niži udjeli klorofila i luteina, dok je u frakciji 2 timijana određen najviši maseni udio luteina u odnosu na ostale dvije frakcije (slika 14). U frakciji 2 uzorka lovora također je ekstrahiran najviši udio luteina te niži udio klorofila, stoga je viši ukupni maseni udio karotenoida i klorofila u frakciji 2 u usporedbi s frakcijom 1, koja je sadržavala niže udjele  $\beta$ -karotena i feofitina *b*.

Od svih analiziranih biljaka, u uzorcima tršlje ekstrahirano je najviše karotenoida i klorofila (97,60 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Ekstrahirani su visoki udjeli feofitina u frakciji 1, luteina i klorofila *b* u frakciji 2, dok je frakcija 3 bila najsiromašnija navedenim spojevima. Viši udjeli luteina su ekstrahirani u acetonskim ekstraktima lišća timijana, lovora i tršlje, vjerojatno i zbog strukture molekule luteina. Naime, lutein je nepolarna molekula, no sadrži jedan atom kisika koji ga čini polarnijim u odnosu na  $\beta$ -karoten (Schoefs, 2002). Također, i u istraživanju Moracelli i sur. (2021) aceton se pokazao kao najučinkovitije otapalo za ekstrakciju ksantofila poput luteina, zeaksantina i violaksantina.

Uzorci pasjeg trna pokazali su specifičnost u sadržaju karotenoida i klorofila u odnosu na ostale analizirane mediteranske biljke. Frakcija 1 je najbogatija karotenoidima i uz  $\beta$ -karoten sadržavala je različite derivate zeaksantina i estere luteina, koji nisu identificirani u ostalim biljnim vrstama. Dok je lutein bio detektiran u svim istraživanim ekstraktima (osim frakcija 1-3 pasjeg trna),  $\beta$ -karoten se uglavnom u najvišem udjelu ekstrahirao u heksanskoj frakciji 1. Od tri korištena otapala, heksan je najviše nepolarnog karaktera, kao i  $\beta$ -karoten, zbog čega je najzastupljeniji u frakciji 1 analiziranih uzoraka (Schoefs, 2002).

#### 4.2.2. Sadržaj polifenolnih spojeva



Slika 27. Ukupni maseni udio polifenolnih spojeva uzoraka mediteranskog bilja u frakcijama 1-3. Frakcija 1 – ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; Frakcija 2 – ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; Frakcija 3 – ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

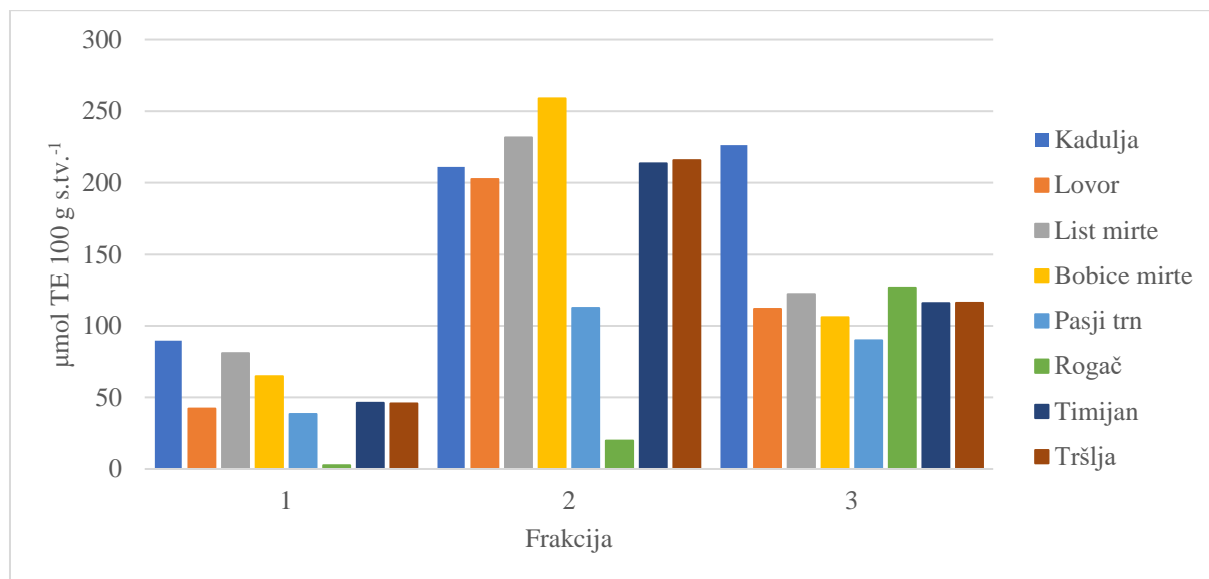
Najviši ukupni maseni udjeli polifenolnih spojeva određeni su u frakciji 2 (otopine 80 %-tnog acetona) svih analiziranih uzoraka mediteranskog bilja, osim kadulje kod koje je u frakciji 3 uočen neznatno viši udio polifenola. Heksan i etil-acetat su nepolarna otapala te su radi toga frakcije 1 sadržavale najniže udjele polifenolnih spojeva. Za ekstrakciju polifenolnih spojeva potrebna su polarnija otapala (Ng i sur., 2020). Generalno, viša ukupna koncentracija fenolnih spojeva postignuta je ekstrakcijom s vodenom otopinom organskih otapala u usporedbi s čistim organskim otapalima (Sultana i sur., 2009). Prema literaturnim podacima 50-80 %-tni etanol te aceton su najučinkovitija otapala za ekstrakciju većine fenolnih spojeva (Dirar i sur., 2019; Oreopoulou i sur., 2019). U ovom istraživanju tijekom uzastopne UAE u frakciji 3, kao otapalo je bio korišten 96 %-tni etanol te je moguće da se većina polifenola ekstrahirala u prethodnoj frakciji s 80 %-tnim acetonom kao otapalom.

Najviši ukupni udio ekstrahiranih polifenola je iz lišća tršlje (5356,29 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), potom iz bobica mirte (2764,55 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i lišća kadulje (2196,76 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Nakon njih slijedi lišće lovora (1151,00 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), timijana (810,65 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i mirte (650,53 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), dok su bobice pasjeg trna i mahune rogača imale najniži ukupni udio polifenolnih spojeva (625,84 i 250,96 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).

Uzorci tršlje u frakciji 2 (2907,37 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i 3 (2424,17 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) bili su najbogatiji polifenolnim spojevima te frakcija 2 bobica mirte (2136,73 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) (slika

27). U svim analiziranim mediteranskim biljkama frakcije 1 su bile najsiromašnije polifenolnim spojevima, što je bilo i očekivano s obzirom na polarnost ekstrakcijskog otapala.

#### 4.2.3. Antioksidacijska aktivnost



Slika 28. Antioksidacijska aktivnost uzoraka mediteranskog bilja određen DPPH metodom u frakcijama 1-3. Frakcija 1 – ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; Frakcija 2 – ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; Frakcija 3 – ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Antioksidacijska aktivnost određena je u svim ekstraktima analiziranih mediteranskih biljaka DPPH metodom. Najniža vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena je u heksanskoj frakciji 1 (2,58-89,67  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ), a najviša u acetonskoj frakciji 2 svih analiziranih mediteranskih biljaka, gdje je također određen najviši maseni udio polifenolnih spojeva (slika 28).

Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti u acetonskim frakcijama 2 određena je u ekstraktu bobica mirte (258,83  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ), dok su najniže vrijednosti određene u acetonskom ekstraktu mahuna rogača (19,92  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ) i bobica pasjeg trna (112,46  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ). Za frakcije 2 lišća kadulje, lovora, mirte, timijana i tršlje određene su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti od 202,47 do 231,65  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ .

U etanolnim ekstraktima, najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena je u ekstraktu lišća kadulje (226,30  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ), dok je najniža vrijednost određena u ekstraktu bobica pasjeg trna (89,75  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ). Etanolni ekstrakti ostalih analiziranih biljaka pokazali su slične vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (105,91-126,43

$\mu\text{mol TE } 100 \text{ g s.tv.}^{-1}$ ) (slika 28). Statistička analiza je pokazala vrlo jaku pozitivnu korelaciju između antioksidacijske aktivnosti u etanolnim ekstraktima i masenih udjela flavona ( $r = 0,96$ ), flavanona ( $r = 0,93$ ) i hidroksicimetnih kiselina ( $r = 0,91$ ). U istraživanju Pereire i sur. (2018) te Dent i sur. (2017) također je utvrđena značajna korelacija između polifenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom. Također, istraživanjem 25 ljekovitih biljaka utvrđena je korelacija udjela polifenolnih spojeva s antioksidacijskom aktivnosti određenom ORAC metodom (Kratchanova i sur., 2010).



## 5. ZAKLJUČCI

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

1. U ekstraktima lišća kadulje viši je udio klorofila u odnosu na karotenoide, a najviši maseni udio je određen u etanolnoj frakciji. U istoj frakciji određen je i najviši udio polifenolnih spojeva, a najzastupljenije skupine polifenola u svim frakcijama su bile lignani (704,24 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), flavoni (642,82 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i flavonoli (394,15 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).
2. U ekstraktima lišća timijana dominirali su klorofili te ih je najviše ekstrahirano u etanolnoj frakciji. Najzastupljeniji su bili klorofili *a* i *b* te feofitini *a* i *b*. U acetonskim i etanolnim frakcijama ekstrahirano je podjednak udio polifenolnih spojeva (367,82 i 354,70 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), od čega najviše lignana (344,39 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksibenzojevih kiselina (229,50 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).
3. U ekstraktima lišća lovora viši je maseni udio klorofila nego karotenoida te je najviše klorofila ekstrahirano u etanolnoj frakciji, dok je karotenoida najviše ekstrahirano u acetonskoj frakciji. I polifenolni spojevi su se najviše ekstrahirali u acetonskoj frakciji, a najzastupljeniji su bili flavonoli (925,20 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).
4. U ekstraktima lišća tršlje identificirano je znatno više klorofila u odnosu na karotenoide, a najviše ih je ekstrahirano u heksanskoj frakciji te su najzastupljeniji bili feofitini *a* i *b*. Za ekstrakciju polifenolnih spojeva 80 %-tni aceton bio je najučinkovitije otapalo, a u sve tri frakcije ukupno, najzastupljeniji polifenolni spojevi su bili hidroksibenzojeve kiseline (2593,27 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i flavonoli (2198,61 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).
5. U ekstraktima lišća mirte određeno je neznatno više karotenoida u odnosu na klorofile, a najviši udio je određen u etanolnoj frakciji, dok karotenoidi i klorofili u bobicama nisu identificirani. Najučinkovitije otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lišća (311,27 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i bobica (2136,73 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) bio je 80 %-tni aceton. U lišću najzastupljeniji su bili flavanoli (292,10 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i flavonoli (199,13 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a u bobicama antocijani (1298,89 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksibenzojeve kiseline (953,09 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).
6. U ekstraktima bobica pasjeg trna nisu identificirani klorofili, a najviši maseni udio karotenoida bio je u heksanskoj frakciji te su najzastupljeniji bili derivati zeaksantina i  $\beta$ -karoten. Najviše polifenolnih spojeva ekstrahirano je u 80 %-tnom acetonu (430,46

mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a najzastupljeniji su bili flavonoli (255,33 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), flavanoli (190,30 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i hidroksibenzojeve kiseline (132,91 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).

7. U ekstraktima mahuna rogača nisu identificirani karotenoidi i klorofili, a u acetonskoj frakciji ekstrahiralo se najviše polifenolnih spojeva (158,62 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) te su u sve 3 frakcije zajedno najzastupljenije bile hidroksibenzojeve kiseline (103,80 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), flavonoli (64,40 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i flavanoli (60,46 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>).
8. Od svih analiziranih mediteranskih biljaka, najviši maseni udio karotenoida i klorofila određen je u lišću tršlje (97,60 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a najniži u bobicama mirte i mahunama rogača, u kojima karotenoidi i klorofili nisu identificirani. Različita ekstrakcijska otapala ekstrahiraju različit udio ukupnih karotenoida i klorofila u analiziranim biljkama, koje se značajno razlikuju po svojim morfološkim i botaničkim karakteristikama. Heksan se pokazao najučinkovitijim otapalom za izolaciju karotenoida i klorofila kod lišća tršlje i bobica pasjeg trna, a 96 %-tni etanol kod lišća kadulje, timijana, lovora i mirte.
9. Od svih analiziranih mediteranskih biljaka, najviše polifenolnih spojeva ekstrahirano je iz lišća tršlje (5356,29 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Dobar izvor polifenola su također bobice mirte (27654,55 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) kao i lišće kadulje (2196,76 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). Iz mahuna rogača (230,96 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i bobica pasjeg trna (625,84 mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) ekstrahirano je najmanje polifenolnih spojeva. Najučinkovitije otapalo za izolaciju polifenolnih spojeva bilo je 80 %-tni aceton.
10. Općenito antioksidacijska aktivnost bila je najviša u acetonskim frakcijama analiziranih biljaka. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti određena je u acetonskoj frakciji bobica mirte (258,83  $\mu$ mol TE 100 g s.tv.<sup>-1</sup>), a najniža u istoj frakciji mahuna rogača (19,92  $\mu$ mol TE 100 g s.tv.<sup>-1</sup>) i etanolnoj frakciji bobica pasjeg trna (89,75  $\mu$ mol TE 100 g s.tv.<sup>-1</sup>). U etanolnim frakcijama utvrđena je značajna korelacija između masenih udjela flavona, flavanona i hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti.

## 6. LITERATURA

Abdelkarim G., Benaicha S., Elmajdoub N., Bellaoui M., Hamal A. (2014) What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **3**(3): 174-179.

Abubakar A.R., Haque M. (2020) Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **12**(1): 1-10.

Agilent Technologies (2017) Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS.

Aguilar C., Borrull F., Marcé R.M. (1996) On-line and off-line solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene-membrane extraction disks for determining pesticides in water by reversed-phase liquid chromatography-diode-array detection. *J. Chromatogr. A* **754**: 77-84.

Al-Jawad F.H., Al-Hussaini J.A., Abbood M.S., Selman M.O. (2016) Hepatoprotective Effect Of *Pistacia Lentiscus*, *Rheum Palmatum* In Ccl4 Induced Model Of Acute Liver Injury. *World J. Pharm. Res.* **5**(7): 53-60.

Alkhatib A. (2020) Antiviral Functional Foods and Exercise Lifestyle Prevention of Coronavirus. *Nutrients* **12**: 2633.

Al-Samarrai O., Naji N.A., Hameed R.R. (2017) Effect of Bay leaf (*Laurus nobilis* L.) and its isolated (flavonoids and glycosides) on the lipids profile in the local Iraqi female rabbits. *Tikrit J. Pure Sci.* **22**(6): 72-75.

Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D.G., Lightfoot D.A. (2017) Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants* **6**: 42.

Altindal D., Altindal N. (2016) Sage (*Salvia officinalis*) Oils. U: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety (Preedy, ur.), Elsevier Ltd, Academic Press, str. 715-721.

Alzand K. (2012) Phytochemical Investigation of the Flavonoids From *Pistacia lentiscus*, *Juniperus phoenices* and *Cupressus sempervirens*. Lap Lambert Academic Publishing, Germany, str. 63-66.

- Alzoubi K.H., Alibbini S., Khabour O.F., El-Elimat T., Al-zubi M., Alali F.Q. (2018) Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Prevents Short-Term Memory Deficit Induced by Chronic Stress in Rats. *J. Mol. Neurosci.* **66**(3): 314-321.
- Aljamal A. (2010) Effects of Bay Leaves on Blood Glucose and Lipid Profiles on the Patients with Type 1 Diabetes. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **70**: 211-214.
- Amessis-Ouchemoukh N., Ouchemoukh S., Meziant N., Idiri Y., Hernanz D., Stinco C.M., Rodríguez-Pulido F.J., Heredia F.J., Madani K., Luis J. (2017) Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Ind. Crops Prod.* **95**: 6-17.
- Ammari M., Othman H., Rtibi K., Sakly M., Abdelmelek H. (2020) The Effects of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) on Emotional Behavior Impairment and Metabolic Disorders Induced by Estrogen Deficiency in Rats. *J. Med. Food*, str. 1-6.
- Andersson S.C., Olsson M.E., Hohansson E., Rumpunen K. (2009) Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin as a Maturity Marker. *J. Agric. Food Chem.* **57**(1): 250-258.
- Arena C., Vitale L., Virzo de Santo A. (2008) Photosynthesis and photoprotective strategies in *Laurus nobilis* L. and *Quercus ilex* L. under summer drought and winter cold. *Plant Biosyst.* **142**(3): 472-479.
- Ayache S.B., Saafi E.B., Emhemmed F., Flamini G., Achour L., Muller C.D. (2020) Biological Activities of Aqueous Extracts from Carob Plant (*Ceratonia siliqua* L.) by Antioxidant, Analgesic and Proapoptotic Properties Evaluation. *Molecules* **25**(14): 3120.
- Azib L., Debbache-Benaida N., Costa G.D., Atmani-Kilani D., Saidene N., Ayouni K., Richard T., Atmani D. (2019) *Pistacia lentiscus* L. leaves extract and its major phenolic compounds reverse aluminium-induced neurotoxicity in mice. *Ind. Crops Prod.* **137**: 576-584.
- Barboni T., Cannac M., Massi L., Perez-Ramirez Y., Chiaramonti N. (2010) Variability of Polyphenol Compounds in *Myrtus Communis* L. (*Myrtaceae*) Berries from Corsica. *Molecules* **15**(11): 7849-7860.

Baricevic D., Bartol T. (2000) The Biological/Pharmacological Activity of the Salvia Genus. U: Sage: The Genus *Salvia* (Kintzios S.E., ur.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Nizozemska, str. 143-184.

Barros L., Tiago Alves C., Dueñas M., Silva S., Oliveira R., Carvalho A.M., Henriques M., Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R. (2013) Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Ind. Crops Prod.* **44**: 104-110.

Belasli A., Ben Miri Y., Aboudaou M., Ouahioue L.A., Montañes L., Ariño A., Djenane D. (2020) Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.): Potential use as wheat preservative. *Food Sci. Nutr.* **8**: 4717-4729.

Belwal T., Ezzat S.M., Rastrelli L., Bhatt I.D., Daglia M., Baldi A. Devkota H.P., Orhan I.E., Patra J.K., Das G. i sur. (2018) A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends Anal. Chem.* **100**: 82-102.

Benchikh Y., Louailèche H. (2014) Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp. *Acta Bot. Gall.* **161**(2): 175-181.

Bennett L., Abeywardena M., Burnard S., Forsyth S., Head R., King K., Patten G., Watkins P., Williams R., Zabarás D., Lockett T. (2013) Molecular Size Fractions of Bay Leaf (*Laurus nobilis*) Exhibit Differentiated Regulation of Colorectal Cancer Cell Growth *In Vitro*. *Nutr. Cancer* **65**(5): 746-764.

Berim A., Yahyaa M., Isaacson T., Marzouk S., Bar E., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E., Ibdah M. (2015) Isolation and Functional Characterization of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 from *Laurus nobilis* L. (Bay Laurel) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **63**(37): 8275-8282.

Biesalski H.-K., Dragsted L.O., Elmadfa I., Grossklaus R., Müller M., Schrenk D., Walter P., Weber P. (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* **25**: 1202-1205.

Boligon A.A., Athayde M.L. (2014) Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Chromatography* **1**(3): 2.

Bouyahya A., Chadon Asseman I.C., Mouzount H., Bourais I., Et-Touys A., Fellah H., Benjouad A., Dakka N., Bakri Y. (2019) Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs? *Ind. Crops Prod.* **128**: 62-69.

Cannell R.J.P. (1998) Natural Products Isolation. Human Press Inc, New Jersey, SAD, str. 165-208.

Carocho M., Barros L., Bento A., Santos-Buelga C., Morales P., Ferreira I.C.F.R. (2014) Castanea sativa Mill. Flowers amongst the Most Powerful Antioxidant Matrices: A Phytochemical Approach in Decoctions and Infusions. *Biomed Res. Int.* **2014**: 232956.

Castro-Puyana M., Perez-Sanchez A., Valdes A., Ibrahim O.H.M., Suarez-Alvarez S., Ferragut J.A., Micol V., Cifuentes A., Ibanez E., Garcia-Canas V. (2017) Pressurized liquid extraction of Neochloris oleoabundans for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Res. Int.* **99**(3): 1048-1055.

Chace D.H., Kalas T.A. (2005) A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin. Biochem.* **38**(4): 296-309.

Chekchaki N., Khaldi T., Rouibah Z., Rouag M., Sekiou O., Messarah M., Boumendjel A. (2017) Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Two Extracts from *Pistacia lentiscus* in Liver and Erythrocytes, in an Experimental Model of Asthma. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **42**: 77-84.

Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* **34**: 540-560.

Chojnacka K., Witek-Krowiak A., Skrzypczak D., Mikula K., Młynarz P. (2020) Phytochemicals containing biologically active polyphenols as an effective agent against Covid-19-inducing coronavirus. *J. Funct. Foods* **73**: 104146.

Ciesarová Z., Murkovic M., Cejpek K., Kreps F., Tobolková B., Koplík R., Belajová E., Kukurová K., Daško L., Panovská B., Revenco D., Burčová Z. (2020) Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Res. Int.* 109170.

- Cindrić M., Marković A., Horvatić A. (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Flum.* **45**(3): 218-232.
- Cioć M., Szewczyk A., Żupnik M., Kalisz A., Pawłowska B. (2017) LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **132**: 433-447.
- Conde E., Fang W., Hemming J., Willför, Domínguez H., Parajó J.C. (2014) Recovery of bioactive compounds from *Pinus pinaster* wood by consecutive extraction stages. *Wood Sci. Technol.* **48**: 311-323.
- Corsi L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi C., Baraldi M. (2002) Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* **73**: 674-684.
- Da Silva B.V., Barreira J.C.M., Oliveira M.B.P.P. (2016) Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends Food Sci. Technol.* **50**: 144-158.
- Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.* **166**: 585-595.
- Dall'Acqua S., Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M.C., Stella L., Greco E., Innocenti G. (2009) Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *J. Med. Food* **12**(4): 869-876.
- Daly T., Jiwan M.A., O'Brien N.M., Aherne A. (2010) Carotenoid Content of Commonly Consumed Herbs and Assessment of Their Bioaccessibility Using an In Vitro Digestion Model. *Plant Foods Hum. Nutr.* **65**(2): 164-169.
- Dasgupta A., Wahed A. (2014) Instrumentation and Analytical Methods. U: Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. Dasgupta A, Wahed A, London, Elsevier, str 7-14.
- Dauqan E.M.A., Abdullah A. (2017) Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **2**(2): 17-22.

- De Villiers A., Lastremau F., Szucs R., Gélébart S., David F., Sandra P. (2006) Evaluation of ultra performance liquid chromatography: Part I. Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* **1127**(1-2): 60-69.
- Dent M., Bursać Kovačević D., Bosiljkov T., Dragović-Uzelac V. (2017) Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.). *Croat. Chem. Acta* **90**(3): 451-459.
- Dent M., Dragović-Uzelac V., Garofulić I.E., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29**(3): 475-484.
- Detti C., Nascimento L.B.S., Brunetti C., Ferrini F., Gori A. (2020) Optimization of a Green Ultrasound-Assisted Extraction of Different Polyphenols from *Pistacia lentiscus* L. Leaves Using a Response Surface Methodology. *Plants* **9**(11): 1482.
- Dirar A.I., Alsaadi D.H.M., Wada M., Mohamed M.A., Watanabe T., Devkota H.P. (2019) Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* **120**: 261-267.
- Donno D., Mellano M.G., Gamba G., Riondato I., Beccaro G.L. (2020) Analytical Strategies for Fingerprinting of Antioxidants, Nutritional Substances, and Bioactive Compounds in Foodstuffs Based on High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Overview. *Foods* **9**: 1734.
- Drmić H-, Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian J. Food Sci. Technol.* **2**(2): 22-33.
- El-Qudah J.M. (2014) Contents of Chlorophyll and Carotenoid Pigments in Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *World Appl. Sci. J.* **29**(10): 1277-1281.
- Fahim M., Shrivastava B., Shrivastava A.K., Ibrahim M., Parveen R., Ahmad S. (2017) Review on extraction methods, antioxidant and antimicrobial properties of volatile oils. *Ann. Phytomed.* **6**(2): 5-46.



Fecka I., Turek S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.* **108**(3): 1039-1053.

Fu Z.H., Wang H., Hu X., Sun Z., Han C. (2013) The pharmacological properties of *salvia* essential oils. *J. Appl. Pharm. Sci.* **3**(7): 122-127.

Galle Toplak K. (2001) Hrvatsko ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb, Hrvatska, str. 128-236.

Garofulić I.E., Kruk V., Martić A., Martić I., Zorić Z., Pedisić S., Dragović S., Dragović-Uzelac V. (2020) Evaluation of Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Pistacia lentiscus* L. Leaves and Fruit Extract Obtained by Optimized Microwave-Assisted Extraction. *Foods* **9**: 1556.

Garofulić I.E., Zorić Z., Pedisić S., Brnčić M., Dragović-Uzelac V. (2018) UPLC-MS2 Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J. Food Sci.* **83**(11): 2782-2789.

Ghorbani A., Esmaeilizadeh M. (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* **7**(4): 433-440.

Gil-Chávez G.J., Villa J.A., Ayala-Zavala J.F., Basilio Heredia J., Sepulveda D., Yahia E.M., González-Aguilar G.A. (2013) Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**: 5-23.

Godlewska-Żyłkiewicz B, Świsłocka R., Kalinowska M., Golonko A., Świdorski G., Arciszewska Ż., Nalewajko-Sieliwoniuk E., Naumowicz M., Lewandowski W. (2020) Biologically Active Compounds of Plants: Structure-Related Antioxidant, Microbiological and Cytotoxic Activity of Selected Carboxylic Acids. *Materials* **13**(19): 4454.

Gori A., Nascimento L.B., Ferrini F., Centritto M., Brunetti C. (2020) Seasonal and Diurnal Variation in Leaf Phenolics of Three Medicinal Mediterranean Wild Species: What Is the Best Harvesting Moment to Obtain the Richest and the Most Antioxidant Extracts? *Molecules* **25**(4): 956.

- Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M.V., Mavromoustakos T., Tzakos A.G. (2016) Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(11): 1875.
- Grebe S.K.G., Singh R.J. (2011) 20. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin. Biochem. Rev.* **32**(1): 5-31.
- Gupta D. (2015) Methods for Determination of Antioxidant Capacity: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **6**(2): 546-566.
- Hadi M.Y., Hameed I.H., Ibraheam I.A. (2017) *Ceratonia siliqua*: Characterization, Pharmaceutical Products and Analysis of Bioactive Compounds: A Review. *Res. J. Pharm. Technol.* **10**(10): 1827-1831.
- Halliwell B. (1996) Antioxidants: The Basics-What They Are and How to Evaluate Them. *Adv. Pharmacol.* **38**: 3-20.
- Harris D.C. (2010) Quantitative Chemical Analysis, 8.izd., W.H. Freeman and Company, New York, SAD, str. 519, 525, 595-615.
- Hennia A., Miguel M.G., Nemmiche S. (2018) Antioxidant Activity of *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. Extracts: A Brief Review. *Molecules* **5**(3): 89.
- Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L. (2003) Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin. Biochem. Rev.* **24**(1): 3-12.
- Hoffmann E. (1996) Tandem mass spectrometry: A primer. *J. Mass Spectrom.* **31**(2): 129-137.
- Honarmand M., Golmohammadi M., Hafezi-bakhtiari J. (2021) Synthesis and characterization of SnO<sub>2</sub> NPs for photodegradation of eriochrome black-T using response surface methodology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **28**(6): 1-11.
- Hossain, M.B., Rai D.K., Brunton N.P., Martin-Diana A.B., Barry-Ryan C. (2010) Characterization of Phenolic Composition in *Lamiaceae* Spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **58**(19): 10576-10581.

Jabri M.-A., Rtibi K., Sakly M., Marzouki L., Sebai H. (2016) Role of gastrointestinal motility inhibition and antioxidant properties of myrtle berries (*Myrtus communis* L.) juice in diarrhea treatment. *Biomed. Pharmacother.* **84**: 1937-1944.

Jalayer-Naderi N., Niakan M., Khodadadi E., Mohamadi-Motlagh M. (2016) The antibacterial activity of methanolic *Anacyclus pyrethrum* and *Pistacia lentiscus* L. extract on *Escherichia coli*. *Iran J. Microbiol.* **8**(6): 372-376.

Jordamović N., Nikšić H., Muratović S., Gusić I., Korić E., Alagić L., Pašić M., Durić K. (2020) Phytochemical Investigation and Antioxidative Capacity of Triterpenes Present in Plant Species Belonging to *Lamiaceae* Family. *Glas. Hem. Technol. Bosne Herceg.* **54**: 19-26.

Kaurinovic B., Vastag D. (2019) Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. U: *Antioxidants in Food and Its Applications*, Shalaby E., ur., IntechOpen. link: <<https://www.intechopen.com/books/antioxidants-in-foods-and-its-applications>> pristupljeno: 06.06.2021.

Kennedy D.O. (2019) Phytochemicals for Improving Aspects of Cognitive Function and Psychological State Potentially Relevant to Sports Performance. *Sports Med.* **49**: S39-S58.

Keys A. (1997) Coronary heart disease in seven countries. 1970. *Nutrition* **13**(3): 250-253.

Knez Hrnčič M., Cör D., Simonovska J., Knez Ž., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. (2020) Extraction Techniques and Analytical Methods for Characterization of Active Compounds in *Origanum* Species. *Molecules* **25**: 4735.

Köksal E., Bursal E., Gülçin İ., Korkmaz M., Çağlayan C., Gören A.C., Alwasel S.H. (2016) Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Int. J. Food Prop.* **20**(3): 514-525.

Kratchanova M., Denev P., Ciz M., Lojek A., Mihailov A. (2010) Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochim. Pol.* **57**(2): 229-234.

Kubatka P., Uramova S., Kello M., Kajo K., Samec M., Jasek K., Vybohova D., Liskova A., Mojzic J., Adamkov M. i sur. (2019) Anticancer Activities of *Thymus vulgaris* L. in Experimental Breast Carcinoma *In Vivo* and *In Vitro*. *Int. J. Mol Sci.* **20**(7): 1749.

Kuete V. (2017) *Thymus vulgaris*. U: Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases (Kuete V., ur.), Academic Press, Elsevier Inc., UK, str. 599-607.

Kumar K., Srivastav S, Sharanagat V.S. (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason. Sonochem.* **70**: 105325.

Kusmita L., Puspitaningrum I., Limantara L. (2014) Identification, Isolation and Antioxidant Activity of Pheophytin from Green Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Procedia Chem.* **14**: 232-238.

Lăcătușu C.-M., Grigorescu, E.-D., Floria, M., Onofriescu A., Mihai B.-M. (2019) The Mediterranean Diet: From an Environment-Driven Food Culture to an Emerging Medical Prescription. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**(6): 942.

Lachkar N., Al-Sobarry M., Hajaji H.E., Lamkinsi T., Lachkar M., Cherrah Y., Alaoui K. (2016) Anti inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua* L methanol barks extract. *J. Chem. Pharm.* **8**(3): 202-210.

Lakkab I., Hajaji H.E., Lachkar N., Bali B.E., Lachkar M., Ciobica A. (2018) Phytochemistry, bioactivity: suggestion of *Ceratonia siliqua* L. as neurodegenerative disease therapy. *J. Complement. Integr. Med.* **15**(4).

Liu R.H. (2004) Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *J. Nutr.* **134**(12): 3479S-3485S.

Lopresti A.L. (2017) Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs R. D.* **17**: 53-64.

Lucci P., Saurina J., Núñez O. (2017) Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *Trends Anal. Chem.* **88**: 1-24.

Maldini M., Chessa M., Petretto G.L., Montoro P., Rourke J.P., Foddai M., Nicoletti M., Pintore G. (2016) Profiling and Simultaneous Quantitative Determination of Anthocyanins in Wild *Myrtus communis* L. Berries from Different Geographical Areas in Sardinia and their Comparative Evaluation. *Phytochem. Anal.* **27**(5): 249-256.

- March R.E., Miao X.-S. (2004) A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *Int. J. Mass Spectrom.* **231**(2-3): 157-167.
- Marrelli M., Statti G., Conforti F. (2020) A Review of Biologically Active Natural Products from Mediterranean Wild Edible Plants: Benefits in the Treatment of Obesity and Its Related Disorders. *Molecules* **25**: 649.
- Martins F., Oliveira I., Barros A., Amaral C., Afonso S., Ferreira H., Gonçalves B. (2016) Leaf age, seasonal and annual variations in *Salvia officinalis* L. var. *Purpurascens* biochemical characteristics. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **89**: 299-306.
- Marxen K., Vanselow K.H., Lippemeier S., Hintze R., Ruser A., Hansen U.-P. (2007) Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors* **7**: 2080-2095.
- Maslo S. (2012) Flora Croatica baza podataka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. <<https://hirc.botanic.hr/fcd/>>. Pristupljeno: 18.2.2021.
- Mehenni C., Atmani-Kilani D., Dumarçay S., Perrin D., Gérardin P., Atmani D. (2016) Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *J. Food Drug Anal.* **24**: 653-669.
- Mehta D. (2021) Objective Review of *Thymus vulgaris*: A Review with Latest Updates on Pharmacological Properties and Phytoconstituents. *Plant Med.*
- Mendes M.M., Gazarini L.C., Rodrigues M.L. (2001) Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments - effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environ. Exp. Bot.* **45**(2): 165-178.
- Messaoud C., Boussaid M. (2011) *Myrtus communis* Berry Color Morphs: A Comparative Analysis of Essential Oils, Fatty Acids, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activities. *Chem. Biodivers.* **8**(2): 300-310.
- Miladinović D., Ilić B., Miladinović Lj., Miladinović M. (2015) Metal and antioxidant contents of sage from Sićevo Gorge nature park. *Acta Medi. Median.* **54**(1): 27-33.

- Mocan A., Babotă M., Pop A., Fizeșan I., Diuzheva A., Locatelli M., Carradori S. i sur. (2020) Chemical Constituents and Biologic Activities of Sage Species: A Comparison between *Salvia officinalis* L., *S. glutinosa* L. and *S. transsylvanica* (Schur ex Griseb. & Schenk) Schur. *Antioxidants* **9**: 480.
- Montoro P., Tuberoso C.I., Perrone A., Piacente S., Cabras P., Pizza C. (2006) Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Chromatogr. A* **1112**(1-2): 232-240.
- Moracelli A.V., Andrade W.S., Frankenberg C.L.C., Rech R., Marcílio N.R. (2021) Extraction of Chlorophylls and Carotenoids from Microalgae: COSMO-SAC-Assisted Solvent Screening. *Chem. Eng. Technol.* Doi: 10.1002/ceat.202100008.
- Moss L., Rouse M., Wesnes K.A., Moss M. (2010) Differential effects of the aromas of *Salvia* species on memory and mood. *Hum. Psychopharmacol.* **25**(5): 388-396.
- Munné-Bosch S., Peñuelas J. (2003) Photo- and Antioxidative Protection During Summer Leaf Senescence in *Pistacia lentiscus* L. Grown under Mediterranean Field Conditions. *Ann. Bot.* **92**(3): 385-391.
- Murillo Amador B., Nieto-Garibay A., Villegas-Espinoza J.A., Troyo-Diequez E., Ramírez-Serrano R., Cordoba M. (2014) Evaluating the best model for measuring chlorophyll in sage leaves in the field using the SPAD-502 meter. *Mitt. Klosterneuburg* **64**(6): 84-100.
- Murkovic M., Gams K., Draxl S., Pfannhauser W. (2000) Development of an Austrian Carotenoid Database. *J. Food Compos. Anal.* **13**: 435-440.
- Nabi F., Arain M.A., Rajput N., Alagawany M., Somro J., Umer M., Soomro F., Wang Z., Ye R., Liu J. (2020) Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **104**: 1809-1818.
- Nahida, Ansari S.H., Siddiqui A.N. (2012) *Pistacia lentiscus*: A review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**: 16-20.

- Nasar-Abbas S.M., Zill-e-Huma, Vu T.-H., Khan M.K., Esbenshade H., Jayasena V. (2015) Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**(1): 63-72.
- Nawel O., Hariri A. (2017) Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of the Flavonoids Extracts from Pods of *Ceratonia siliqua* L. *J. Pharm. Pharm.* **4**(2): 159-165.
- Ng Z.X., Samsuri S.N., Yong P.H. (2020) The antioxidant index and chemometric analysis of tannin, flavonoid, and total phenolic extracted from medicinal plant foods with the solvents of different polarities. *J. Food Process. Preserv.* **44**(9): e14680.
- Nieto G. (2020) A Review on Applications and Uses of Thymus in the Food Industry. *Plants* **9**: 961.
- Niki E. (2010) Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 503-515.
- Oldways (2021) Mediterranean Diet. <<https://oldwayspt.org/traditional-diets/mediterranean-diet>>. Pristupljeno 2. veljače 2021.
- Oreopoulou A., Tsimogiannis D., Oreopoulou V. (2019) Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. U: *Polyphenols in Plants*, 2 izd. (Watson R.R., ur.), Academic Press: Cambridge, MA, USA, str. 243-259.
- Othmen K.B., Garcia-Beltrán J.M., Elfalleh W., Haddad M., Esteban M.Á. (2021) Phytochemical Compounds and Biological Properties of Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) Extracts at Different Ripening Stages. *Waste Biomass Valorization*. Doi: 10.1007/s12649-021-01352-x.
- Pacifico S., Gallicchio M., Lorenz P., Duckstein S.M., Potenza N. Galasso S., Marciano S., Fiorentino A., Stintzing F.C., Monaco P. (2014) Neuroprotective Potential of *Laurus nobilis* Antioxidant Polyphenol Enriched Leaf Extracts. *Chem. Res. Toxicol.* **27**(4): 511-626.
- Pacifico S., Piccolella S., Papale F., Nocera P., Lettieri A., Catauro M. (2016) A polyphenol complex from *Thymus vulgaris* L. plants cultivated in the Campania Region (Italy): New perspectives against neuroblastoma. *J. Funct. Foods* **20**: 253-266.

Papagiannopoulos M., Wollseifen H.R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R. (2004) Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* **52**(12): 3784-3791.

Pereira O.R., Catarino M.D., Afonso A.F., Silva A.M., Cardoso S.M. (2018) *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules* **23**: 3169.

Pinheiro P.F., Justino G.C. (2012) Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds- A Review of Spectroscopic Applications. U: Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health (Rao V., ur.), InTech, Rijeka, Croatia. Str. 33-56.

Pisoschi A.M., Negulescu G.P. (2011) Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* **1**: 1.

Pitt J.J. (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **30**(1): 19-34.

Pop R.M., Socaciu C., Pinteau A., Buzoianu A.D., Sanders M.G., Gruppen H., Vincken J.-P. (2013) UHPLC/PDA-ESI/MS Analysis of the Main Berry and Leaf Flavonol Glycosides from Different Carpathian *Hippophae rhamnoides* L. Varieties. *Phytochem. Anal.* **24**(5): 484-492.

Pop R.M., Weesepeel Y., Socaciu C., Pinteau A., Vincken J.-P., Gruppen H. (2014) Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem.* **147**: 1-9.

Prasanth R.V., Ravi V.K., Varsha P.V., Satyam S. (2014) Review on *Thymus vulgaris* Traditional Uses and Pharmacological Properties. *Med. Aromat. Plants* **3**(3).

Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4290-4302.

Pundir S., Garg P., Dwiwedi A., Ali A., Kapoor V.K., Kapoor D. Kulshrestha S., Lal U.R., Negi P. (2020) Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review. *J. Ethnopharmacol.* 113434.



Putnik P., Lorenzo J.M., Barba F.J., Roohinejad S., Režek Jambrak A., Granato D., Montesano D., Bursać Kovačević D. (2018) Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods* **7**: 106.

Rezai S., Eternadi N., Nikbakht A., Yousefi M., Majidi M.M. (2018) Effect of Light Intensity on Leaf Morphology, Photosynthetic Capacity, and Chlorophyll Content in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* **36**(1): 46-57.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **20**(1): 933-956.

Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A.-H., Khalel K.I. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod.* **43**: 827-831.

Seger C., Griesmacher A. (2007) Some important aspects of implementing tandem mass spectrometry. *Biochem. Med.* **17**(1): 29-51.

Rojas J., Buitrago A. (2019) Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. U: *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (Segura Campos, ur.). Woodhead Publishing, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 3-20.

Roviello V., Roviello G.N. (2021) Lower COVID-19 mortality in Italian forested areas suggests immunoprotection by Mediterranean plants. *Environ. Chem. Lett.* **19**: 699-710.

Rtibi K., Selmi S., Grami D., Mohamed A., Eto B., El-benna J., Sebai H., Marzouki L. (2017) Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomed. Pharmacother.* **93**: 522-528.

Said S.A., Torre F., Derridj A., Gauquelin T., Mevy J.P. (2013) Gender, mediterranean drought, and seasonality: photosystem II photochemistry in *Pistacia lentiscus* L. *Photosynthetica* **51**(4): 552-564.

Saini R.K., Nile S.H., Park S.W. (2015) Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Res. Int.* **76**(3): 735–750.

Salehi B., Azzini E., Zucca P., Varoni E.M., Kumar N.V.A., Dini L., Panzarini E., Rajkovic J., Fokou P.V.T., Peluso I. i sur. (2020) Plant-Derived Bioactives and Oxidative Stress-Related Disorders: A Key Trend towards Healthy Aging and Longevity Promotion. *Appl. Sci.* **10**: 947.

Salhi A., Bellaouchi R., Barkany S.E., Rokni Y., Bouyanzer A., Asehraou A., Hassan A., Zarrouk A., Hammouti B. (2019) Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Pistacia lentiscus*. *Casp. J. Environ. Sci.* **17**(3): 189-198.

Samide A., Tutunaru B. (2017) Thermal behavior of the chlorophyll extract from a mixture of plants and seaweed. *J. Therm. Anal. Calorim.* **127**: 597-604.

Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K.M., Yoga Latha L. (2010) Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **8**(1): 1-10.

Schoefs B. (2002) Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **13**(11): 361-371.

Sharafzadeh S., Alizadeh O. (2011) Chlorophyll a, Chlorophyll b and Carotenoids of Garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) as Affected by Nutrients. *Adv. Environ. Biol.* **5**(12): 3725-3728.

Sharma Y., Velamuri R., Fagan J., Schaefer J., Streicher C., Stimson J. (2020) Identification and Characterization of Polyphenols and Volatile Terpenoid Compounds in Different Extracts of Garden Sage (*Salvia officinalis* L.). *Pharmacogn. Res.* **12**(2): 149-157.

Shinjyo N., Green J. (2017) Are sage, rosemary and lemon balm effective interventions in dementia? A narrative review of the clinical evidence. *Eur. J. Integr. Med.* **15**: 83-96.

Sisay M., Gashaw T. (2017) Ethnobotanical, Ethnopharmacological, and Phytochemical Studies of *Myrtus communis* Linn: A Popular Herb in Unani System of Medicine. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* **22**(4): 1035-1043.

Snoussi A., Hayet B.H.K., Essaidi I., Zgoulli S., Moncef C.M., Thonart P., Bouzouita N. (2012) Improvement of the Composition of Tunisian Myrtle Berries (*Myrtus communis* L.) Alcohol Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **60**(2): 608-614.

Sofi F., Cesari F., Abbate R., Gensini G., Casini A. (2008) Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *Br. Med. J.* **337**(7671): a1344.

- Stefanova G., Girova T., Gochev V., Stoyanova M., Petkova Z., Stoyanova A., Zheljaskov V.D. (2020) Comparative study on the chemical composition of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves from Greece and Georgia and the antibacterial activity of their essential oil. *Heliyon* **6**: e05491.
- Sultana B., Anwar F., Ashraf M. (2009) Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* **14**(6): 2167-2180.
- Sumbul S., Ahmad M.A., Akhtar M. (2011) *Myrtus communis* Linn. - A review. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* **2**(4): 395-402.
- Suryakumar G., Gupta A. (2011) Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Ethnopharmacol.* **138**(2): 268-278.
- Taamalli A., Iswaldi I., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Zarrouk M. (2013) UPLC–QTOF/MS for a Rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L. *Phytochem. Anal.* **25**(1): 89-96.
- Taghouti M., Martins-Gomes C., Félix L.M., Schäfer J., Santos J.A., Bunzel M., Nunes F.M., Silva A.M. (2020) Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: comparison with endemic Iberian *Thymus* species. *Food Chem.* 127362.
- Tambur Z., Miljković-Selimović B., Opačić D., Aleksić E., Ivančajić L., Jovičić B., Vuković B. (2020) Inhibitory effects of different medicinal plants on the growth of some oral microbiome members. *Med. Weter.* **76**(8): 476-479.
- Thomas R., Butler E., Macchi F., Williams M. (2015) Phytochemicals in cancer prevention and management? *Br. J. Med. Pract.* **8**(2): a815.
- Thurman E.M., Ferrer I., Fernández-Alba A. (2005) LC-MS. I: Basic principles and technical aspects of LC-MS for pesticide analysis. *Compr. Anal. Chem.* **43**: 369-401.
- Tolstikov V.V., Fiehn O. (2002) Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **301**(2): 298-307.
- Tuberoso C.I.G., Rosa A., Bifulco E., Melis M.P., Atzeri A., Pirisi F.M., Dessì M.A. (2010) Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L.berries extracts. *Food Chem.* **123**: 1242-1251.

- Tumen I., Senol F.S., Orhan I.E. (2011) Inhibitory potential of the leaves and berries of *Myrtus communis* L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**(4): 387-392.
- Tundis R., Leporini M., Bonesi M., Rovito S., Passalacqua N.G. (2020) *Salvia officinalis* L. from Italy: A Comparative Chemical and Biological Study of Its Essential Oil in the Mediterranean Context. *Molecules* **25**: 5826.
- Velamuri R., Sharma Y., Fegan J., Schaefer J. (2020) Application of UHPLC-ESI-QTOF-MS in Phytochemical Profiling of Sage (*Salvia officinalis*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Planta Med. Int. Open* **7**: e133-e144.
- Vuković-Gaćić B., Nikčević S., Berić-Bjedov T., Knežević-Vukčević J., Simić D. (2006) Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Toxicol.* **44**(10): 1730-1738.
- Walker J.B., Sysmsma K.J., Treutlein J., Wink M. (2004) *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *Am. J. Bot.* **91**(7): 1115-1125.
- Wani T.A., Wani S.M., Ahmad M., Ahmad M., Gani A., Masoodi F.A. (2016) Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Cogent Food Agric.* **2**(1).
- Weemaes C.A., Ooms V., Van Loey A.M., Hendrickx M.E. (1999) Kinetics of Chlorophyll Degradation and Color Loss in Heated Broccoli Juice. *Journal of Agricultural and Food Chem.* **47**(6): 2404-2409.
- Wiseman H. (2013) Phytochemicals: Health Effects. U: Encyclopedia of Human Nutrition (Caballero B., ur.), 3. izd, Elsevier Ltd, Academic Press, str. 47-51.
- Yangui I., Younsi F., Ghali W., Boussaid M., Messaoud C. (2021) Phytochemicals, antioxidant and anti-proliferative activities of *Myrtus communis* L. genotypes from Tunisia. *S. Afr. J. Bot.* **137**: 35-45.

Ydjedd S., Chaalal M., Richard G., Kati D.E., López-Nicolás R., Fauconnier M.L., Louailèche H. (2017) Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratonia siliqua* L. pods during ripening stages. *Int. Food Res. J.* **24**(5): 2041-2049.

Yoshimura M., Amakura Y., Tokuhara M., Yoshida T. (2008) Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J. Nat. Med.* **62**(3): 366-368.

Zadernowski R., Naczek M., Czaplicki S., Rubinskiene M., Szalkiewicz M. (2005) Composition of Phenolic Acids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82**(3): 175-179.

Zakynthinos G., Varzakas T. (2015) *Hippophae Rhamnoides*: Safety and Nutrition. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **3**(2): 89-97.

Zeb A. (2004) Important Therapeutic Uses of Sea Buckthorn (*Hippophae*): A Review. *J. Biol. Sci.* **4**: 687-693.

Zhong Y., Shahidi F. (2015) Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. U: Handbook of Antioxidants for Food Preservation (Shahidi, ur.). Woodhead Publishing, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 287-333.

Zitouni A., Belyagoubi-Benhammou N., Ghembaza N., Toul F., Atik-Bekkara F. (2016) Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **8**(4): 627-633.

## 7. PRILOZI

Tablica P1. Fenolni spojevi lišća kadulje i timijana

Maseni udio spoja (mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>)

<b>FLAVONOIDI</b>	K1	K2	K3	TI1	TI2	TI3
<i>Flavonoli</i>						
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	/	2,97±0,14	5,70±0,37	/	3,63±0,16	0,70±0,02
Kamferol-3- <i>O</i> -rutinozid	/	266,94±11,12	91,92±2,51	/	19,39±0,87	4,82±0,14
Rutin	4,90±0,21	5,68±0,27	9,23±0,56	4,90±0,18	25,33±1,15	6,59±0,41
Izoramnetin	/	/	0,79±0,02	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid	/	3,17±0,17	2,85±0,15	/	1,53±0,08	1,34±0,04
<b>Ukupni flavonoli</b>	4,90	278,76	110,49	4,90	49,88	13,45
<i>Flavoni</i>						
Apigenin	/	4,21±0,18	/	/	5,47±0,29	3,09±0,17
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	3,12±0,13	20,12±0,98	24,83±1,10	3,09±0,15	11,49±0,37	3,09±0,14
Apigenin-7- <i>O</i> -rutinozid	/	12,99±0,50	6,40±0,39	/	/	/
Luteolin	1,25±0,05	4,26±0,15	11,69±0,48	1,24±0,03	7,57±0,51	2,06±0,09
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	1,25±0,06	47,27±2,11	336,19±18,17	1,58±0,05	25,82±1,09	5,52±0,31
Luteolin-7- <i>O</i> -rutinozid	/	127,59±7,13	41,65±1,89	/	7,43±0,46	3,15±0,15
<b>Ukupni flavoni</b>	5,62	216,44	420,76	5,91	57,77	16,91
<i>Flavanoli</i>						
Epikatehin	3,27±0,15	8,97±0,43	2,79±0,09	/	/	/
Galokatehin	/	0,46±0,01	0,46±0,02	/	1,26±0,02	0,96±0,01
<b>Ukupni flavanoli</b>	3,27	9,43	3,24	/	1,26	0,96
<i>Flavanoni</i>						
Hesperidin	/	5,33±0,31	13,03±0,86	/	14,20±0,98	4,09±0,25
<i>Lignani</i>						
Karnozinska kiselina	197,65±6,87	155,75±7,31	172,93±6,34	34,52±1,76	7,04±0,35	117,98±5,45
Metil karnozat	11,91±0,67	23,90±0,99	102,64±4,14	18,16±1,02	4,74±0,15	7,24±0,28
Karnozol	/	/	/	14,85±0,97	2,63±0,09	131,20±4,27
Mediorezinol	/	28,43±1,12	4,03±0,18	/	4,33±0,16	0,81±0,03
Epirozmanol	0,98±0,04	3,00±0,13	1,63±0,09	/	0,33±0,01	0,56±0,02
Salvigenin	0,45±0,01	0,41±0,01	0,53±0,02	/	/	/
<b>Ukupni lignani</b>	210,99	211,49	281,76	67,53	19,07	257,79
<b>FENOLNE KISELINE</b>	K1	K2	K3	TI1	TI2	TI3
<i>Hidroksibenzojeve kiseline (HBK)</i>						

<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	/	109,28±3,78	131,36±5,12	/	162,00±5,26	35,06±1,25
Protokatehinska kiselina	/	3,03±0,17	3,19±0,13	/	8,55±0,38	3,31±0,09
Vanilinska kiselina	/	/	/	7,43±0,56	8,76±0,25	4,39±0,18
<b>Ukupne HBK</b>	/	112,31	134,55	7,43	179,30	42,77
<i>Hidroksicimetne kiseline (HCK)</i>						
Kava kiselina	12,47±0,97	7,77±0,47	7,88±0,35	2,37±0,10	16,50±0,95	10,98±0,76
Heksozid kava kiseline	/	15,88±1,06	10,19±0,67	/	11,02±0,43	1,57±0,02
Klorogenska kiselina	/	/	/	/	1,14±0,19	0,18±0,01
Ferulinska kiselina	/	25,76±1,05	23,86±0,96	/	/	/
<i>p</i> -kumarinska kiselina	/	3,07±0,10	6,20±0,29	/	/	/
Ružmarinska kiselina	0,87±0,03	32,45±1,26	26,18±1,17	/	17,66±1,02	6,02±0,21
Sagerinska kiselina	/	0,65±0,02	0,51±0,02	/	/	/
Salvianolna kiselina	/	0,66±0,02	/	/	/	/
<b>Ukupne HCK</b>	13,34	86,24	74,82	2,37	6,33	18,75

K1 i TI1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; K2 i TI2– frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; K3 i TI3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Tablica P2. Fenolni spojevi lišća lovora i tršlje

Maseni udio spoja (mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>)

<b>FLAVONOIDI</b>	L1	L2	L3	TR1	TR2	TR3
<i>Flavonoli</i>						
Kvercetin-3- <i>O</i> -pentozid	/	11,98±0,74	2,75±0,07	/	2,70±0,08	1,92±0,07
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,39±0,01	277,87±11,37	73,92±2,89	/	6,38±0,26	6,07±0,25
Kvercitrin	/	/	/	/	9,41±0,31	5,18±0,18
Kvercetin acetyl-rutinozid	/	/	/	0,53±0,01	0,38±0,01	0,45±0,01
Kamferol-3- <i>O</i> -pentozid	/	52,52±1,17	12,55±0,76	/	7,68±0,21	/
Kamferol-3- <i>O</i> -heksozid	/	209,80±7,68	36,71±1,12	2,81±0,75	203,36±8,56	127,47±3,51
Kamferol-3- <i>O</i> -rutinozid	/	30,00±0,96	6,84±0,21	/	18,85±0,85	12,95±0,51
Kamferol-3- <i>O</i> -ramnozid	/	/	/	2,81±0,16	4,91±0,17	3,22±0,09
Kamferol ramnozil-heksozid	/	/	/	/	9,64±0,25	16,91±0,96
Kamferol pentozil-heksozid	/	/	/	/	4,73±0,11	2,91±0,08
Miricetin	/	/	/	/	157,51±3,67	95,13±2,78
Miricetin-3- <i>O</i> -ramnozid	/	/	/	/	389,96±20,11	205,12±5,65
Miricetin-3- <i>O</i> -rutinozid	/	/	/	/	45,69±1,19	32,24±1,26

Miricetin-3- <i>O</i> -glukuronid	/	/	/	/	628,64±31,56	166,49±4,21
Rutin	/	86,79±2,64	24,03±1,07	/	12,91±0,92	13,65±0,87
Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid	1,01±0,04	78,56±2,17	19,49±1,01	/	/	/
<b>Ukupni flavonoli</b>	1,40	747,53	176,28	6,16	1502,74	689,71
<i>Flavoni</i>						
Apigenin-3- <i>O</i> -pentozid	/	/	/	/	/	3,65±0,09
Luteolin	/	23,15±0,97	5,68±0,12	4,08±0,11	11,72±0,53	13,18±0,37
<b>Ukupni flavoni</b>	/	23,15	5,68	4,08	11,72	16,83
<i>Flavanoli</i>						
Katehin	/	2,44±0,08	4,80±0,13	0,12±0,01	0,99±0,01	12,83±0,67
Epikatehin	2,75±0,07	56,01±1,17	113,59±2,78	4,14±0,16	31,70±1,12	300,45±9,54
Epikatehin galat	/	/	/	/	12,83±0,67	7,96±0,29
Epigalokatehin galat	/	/	/	/	29,61±1,11	107,79±2,19
Procijanidin B2	/	/	/	/	3,57±0,09	/
<b>Ukupni flavanoli</b>	2,75	58,46	118,39	4,26	78,70	429,03
<b>FENOLNE KISELINE</b>	L1	L2	L3	TR1	TR2	TR3
<i>Hidroksibenzojeve kiseline (HBK)</i>						
Galna kiselina	/	/	/	4,24±0,11	11,15±0,67	14,33±0,78
Monogaloil glukoza	/	/	/	/	87,34±2,89	123,02±3,52
Digaloil kinična kiselina	/	/	/	3,00±0,10	812,08±25,65	605,95±19,91
Trigaloil kinična kiselina	/	/	/	3,00±0,12	225,46±4,90	437,94±17,15
5- <i>O</i> -galoil kinična kiselina	/	/	/	/	148,84±3,51	97,12±3,76
3- <i>O</i> -ferulil kinična kiselina	/	/	/	/	19,80±0,87	/
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	/	6,01±0,24	/	/	/	/
Protokatehinska kiselina	/	11,36±0,96	/	/	/	/
<b>Ukupne HBK</b>	/	17,36	/	10,24	1304,67	1278,35
<i>Hidroksicimetne kiseline (HCK)</i>						
Kava kiselina	/	/	/	/	9,54±0,34	10,24±0,36

L1 i TR1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; L2 i TR2 – frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; L3 i TR3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu



Tablica P3. Fenolni spojevi lišća i bobica mirte

Maseni udio spoja (mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>)

FLAVONOIDI	ML1	ML2	ML3	MB1	MB2	MB3
<i>Flavonoli</i>						
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	/	5,66±0,10	1,00±0,04	1,59±0,07	175,94±4,58	83,54±3,45
Kvercitrin	0,84±0,03	4,55±0,07	1,04±0,03	0,53±0,01	9,89±0,05	1,90±0,11
Miricetin	12,30±0,54	105,49±3,58	31,06±1,34	10,00±0,04	53,35±1,27	20,44±0,90
Miricetin-3- <i>O</i> -galaktozid	0,27±0,01	5,68±2,31	1,54±0,05	0,88±0,02	6,19±0,19	2,26±0,03
Miricetin-3- <i>O</i> -ramnozid	0,18±0,01	7,91±0,30	1,80±0,04	7,53±0,21	5,81±0,29	1,49±0,02
Miricetin-3- <i>O</i> -arabinozid	/	/	/	0,14±0,01	51,65±1,89	12,52±0,31
Rutin	6,38±0,21	4,87±0,17	8,56±0,38	/	/	/
<b>Ukupni flavonoli</b>	19,97	134,16	45,00	20,67	302,83	122,14
<i>Flavoni</i>						
Luteolin	1,26±0,06	5,12±0,13	2,43±0,09	1,76±0,06	1,69±0,06	5,16±0,20
<i>Flavanoli</i>						
Katehin	0,20±0,01	0,51±0,04	0,85±0,02	/	/	/
Epikatehin	6,04±0,19	9,43±0,31	19,12±1,10	/	/	/
Epigalokatehin galat	/	64,52±2,54	191,43±6,78	2,35±0,07	5,12±0,10	15,77±0,61
<b>Ukupni flavanoli</b>	6,24	74,46	211,40	2,35	5,12	15,77
<i>Antocijani</i>						
Delfinifin-3- <i>O</i> -pentozid	/	/	/	0,14±0,01	96,79±1,87	37,33±1,17
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	/	/	/	0,53±0,02	110,26±4,54	51,10±1,28
Delfinidin-3- <i>O</i> -arabinozid	/	/	/	0,14±0,01	97,26±1,16	36,89±0,97
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	/	/	/	0,34±0,01	30,07±1,01	9,30±0,41
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	/	/	/	0,14±0,01	287,62±9,89	100,61±3,94
Petunidin-3- <i>O</i> -pentozid	/	/	/	/	53,75±1,12	17,34±0,56
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	/	/	/	0,14±0,01	174,09±6,92	66,72±1,07
Petunidin-3- <i>O</i> -arabinozid	/	/	/	0,14±0,01	53,38±1,05	17,11±0,41
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	/	/	/	0,24±0,01	43,91±1,16	13,55±0,45
<b>Ukupni antocijani</b>	/	/	/	1,80	947,13	349,95
<b>FENOLNE KISELINE</b>						
<i>Hidroksibenzojeve kiseline (HBK)</i>						
Galna kiselina	6,52±0,25	11,57±0,89	8,13±0,28	/	13,18±0,45	10,47±0,31
Digaloil kinična kiselina	/	8,09±0,38	/	/	309,33±9,67	53,47±1,87
5- <i>O</i> -galoil kinična kiselina	3,07±0,09	73,42±2,12	10,08±0,43	/	551,93±19,86	14,70±0,59
<b>Ukupne HBK</b>	9,59	93,08	18,21	/	874,44	78,65

*Hidroksicimetne kiseline (HCK)*

Kava kiselina	12,12±0,31	4,45±0,18	13,04±0,45	15,83±0,65	5,52±0,13	13,73±0,41
---------------	------------	-----------	------------	------------	-----------	------------

ML1 i MB1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; ML2 i MB2– frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; ML3 i MB3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

Tablica P4. Fenolni spojevi bobica pasjeg trna i mahuna rogača

Maseni udio spoja (mg 100 g s.tv.<sup>-1</sup>)

FLAVONOIDI	PT1	PT2	PT3	R1	R2	R3
<i>Flavonoli</i>						
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,41±0,01	2,98±0,09	1,73±0,05	0,62±0,02	3,06±0,13	0,93±0,03
Kvercetin-3- <i>O</i> -arabinozid	/	/	/	/	1,88±0,06	1,73±0,05
Kvercitrin	0,41±0,01	2,34±0,07	0,51±0,02	0,57±0,01	10,81±0,50	1,33±0,05
Kvercetin-3- <i>O</i> -soforozid-7- <i>O</i> -ramnozid	/	1,41±0,04	/	/	/	/
Kamferol	4,12±0,11	25,93±0,96	33,45±1,01	/	/	/
Kamferol-3- <i>O</i> -rutinozid	/	17,42±0,65	2,96±0,09	/	/	/
Kamferol-3- <i>O</i> -ramnozid	5,73±0,17	12,68±0,61	4,44±0,10	/	/	/
Kamferol-3- <i>O</i> -soforozid-7- <i>O</i> -ramnozid	/	8,05±0,23	/	/	/	/
Miricetin-3- <i>O</i> -glukozid	/	/	/	/	7,13±0,21	18,69±0,65
Miricetin-3- <i>O</i> -ramnozid	/	/	/	8,39±0,25	9,28±0,25	/
Rutin	/	38,90±1,14	17,72±0,98	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid	/	32,81±1,06	3,07±0,07	/	/	/
Izoramnetin-3,7- <i>O</i> -diheksozid	/	2,22±0,09	/	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid	0,43±0,01	11,86±0,71	3,03±0,07	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -ramnozid	1,51±0,05	8,88±0,31	1,59±0,05	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -sinapoglukozid-glukozid-7- <i>O</i> -ramnozid	0,56±0,02	1,07±0,03	0,45±0,01	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -soforozid-7- <i>O</i> -ramnozid	/	2,39±0,10	2,42±0,08	/	/	/
Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid-7- <i>O</i> -glukozid	/	1,87±0,09	/	/	/	/
<b>Ukupni flavonoli</b>	13,17	170,80	71,36	9,57	32,16	22,67
<i>Flavoni</i>						

Luteolin	2,00±0,07	3,47±0,10	4,91±0,21	/	2,30±0,06	/
<i>Flavanoli</i>						
Katehin	0,34±0,01	5,97±0,19	1,03±0,03	/	1,44±0,03	0,26±0,01
Epikatehin	2,90±0,10	146,74±3,17	33,34±0,99	/	33,83±1,01	5,92±0,18
Epikatehin galat	/	/	/	/	5,06±0,16	3,09±0,12
Epigalokatehin galat	/	/	/	/	4,60±0,14	6,26±0,25
<b>Ukupni flavanoli</b>	3,23	152,70	34,27	/	44,94	15,52
<b>FENOLNE KISELINE</b>	PT1	PT2	PT3	R1	R2	R3
<i>Hidroksibenzojeve kiseline (HBK)</i>						
Galna kiselina	/	5,38±0,21	/	/	79,23±2,51	24,57±0,96
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	3,16±0,12	4,61±0,20	7,28±0,29	/	/	/
Protokatehinska kiselina	/	44,94±1,98	17,46±0,56	/	/	/
Vanilinska kiselina	4,83±0,18	24,45±1,27	20,79±0,76	/	/	/
<b>Ukupne HBK</b>	7,99	79,38	45,54	/	79,23	24,57
<i>Hidroksicimetne kiseline (HCK)</i>						
Kava kiselina	1,43±0,05	14,00±0,65	11,38±0,31	/	/	/
<i>p</i> -kumarinska kiselina	/	10,11±0,29	/	/	/	/
<b>Ukupne HCK</b>	1,43	24,11	11,38	/	/	/

PT1 i R1 – frakcija 1 ekstrahirana heksanom i otopljena u etil-acetatu; PT2 i R2– frakcija 2 ekstrahirana i otopljena u 80 %-tnom acetonu; PT3 i R3 – frakcija 3 ekstrahirana i otopljena u 96 %-tnom etanolu

## **IZJAVA O IZVORNOSTI**

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

D. Pfeifer

---

Danijela Pfeifer