

Karakterizacija polifenolne i ugljikohidratne frakcije talijanskog ljulja i slame heljde

Budisavljević, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:587753>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Mateja Budisavljević

**KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNE I
UGLJIKOHIDRATNE FRAKCIJE
TALIJANSKOG LJULJA I SLAME HELJDE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom doc. dr. sc. Aleksandre Vojvodić Cebin.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „*Biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz neprehrambenih lignoceluloznih sirovina*“ (Biorefinery-NFLRM; IP-2022-10-3075), voditelja prof. dr. sc. Božidara Šanteka (PBF), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

KARAKTERIZACIJA POLIFENOLNE I UGLJIKOHIDRATNE FRAKCIJE TALIJANSKOG LJULJA I SLAME HELJDE

Mateja Budisavljević, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215430

Sažetak: Talijanski ljulj (TLJ) i slama heljde (SH) tradicionalno se koriste u prehrani životinja i kao poboljšivači tla, dok su inovativne primjene relativno neistražene. Cilj ovoga rada bila je karakterizacija polifenolne i ugljikohidratne frakcije talijanskog ljulja i slame heljde kako bi se proširile dosadašnje spoznaje o mogućnostima njihove valorizacije. U skladu s time, pripremljeni su ekstrakti konvencionalnom i mikrovalnom ekstrakcijom te su određeni udjeli ukupnih i pojedinačnih slobodnih i vezanih polifenola te antioksidacijski kapacitet. Povećanje udjela etanola u otapalu pozitivno je utjecalo na ekstraktabilnost slobodnih polifenola, među kojima je najzastupljeniji bio rutin (TLJ 376 $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$, SH 6434 $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Od vezanih fenolnih spojeva, *t*-ferulinska (*t*-FA) i *p*-kumarinska kiselina (*p*-CA) određene su u oba uzorka, a najviše u talijanskom ljulju (*t*-FA 2300 $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$, *p*-CA 1010 $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Ugljikohidratna frakcija karakterizirana je s obzirom na monomerni sastav strukturnih polisaharida i udio vlakana, na temelju čega su određeni udjeli celuloze, hemiceluloze i lignina.

Ključne riječi: lignoceluloza, polifenolni spojevi, slama heljde, strukturni ugljikohidrati, talijanski ljulj

Rad sadrži: 47 stranica, 15 slika, 5 tablica, 80 literaturnih navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodić Cebin

Komentor: /

Pomoć pri izradi: /

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Draženka Komes (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Aleksandra Vojvodic Cebin (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (član)
4. izv. prof. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustač (zamjenski član)

Datum obrane: 30. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

CHARACTERIZATION OF PHENOLIC AND CARBOHYDRATE FRACTIONS OF ITALIAN RYEGRASS
AND BUCKWHEAT HAY

Mateja Budisavljević, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215430

Abstract: Italian ryegrass (IRG) and buckwheat straw (BS) are traditionally used as animal feed and as soil enhancers, while their innovative applications are relatively unexplored. The aim of this work was to characterize the polyphenolic and carbohydrate fractions of italian ryegrass and buckwheat straw in order to expand the existing knowledge on their valorization potential. In accordance, extracts were prepared by conventional and microwave extraction, followed by the determination of total and individual free and bound polyphenols and antioxidant capacity. Increasing the proportion of ethanol in the solvent had a positive effect on the extractability of free polyphenols, among which rutin was the most abundant (IRG $376 \mu\text{g g}_{\text{dry matter}}^{-1}$ and BS $6434 \mu\text{g g}_{\text{dry matter}}^{-1}$). Among bound phenolic compounds, *t*-ferulic and *p*-coumaric acid were determined in both samples, while most in italian ryegrass (*t*-ferulic ($2300 \mu\text{g g}_{\text{dry matter}}^{-1}$) and *p*-coumaric ($1010 \mu\text{g g}_{\text{dry matter}}^{-1}$)). The carbohydrate fraction was characterized with regard to the monomeric composition of structural polysaccharides and the content of fiber, based on which the contents of cellulose, hemicellulose and lignin were determined.

Keywords: lignocellulose, polyphenolic compounds, buckwheat straw, structural carbohydrates, italian ryegrass

Thesis contains: 47 pages, 15 figures, 5 tables, 80 references, 3 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Aleksandra Vojvodić Cebin, PhD, Assistant professor

Co-mentor: /

Technical support and assistance: /

Reviewers:

1. Draženka, Komes, PhD, Full professor (president)
2. Aleksandra, Vojvodic Cebin, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Antonija, Trontel, PhD, Associate professor (member)
4. Nikolina, Čukelj Mustač, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 30th September, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. TALIJANSKI LJULJ	3
2.1.1. Primjena talijanskog ljulja	4
2.1.2. Bioaktivni spojevi talijanskog ljulja	4
2.2. HELJDA	4
2.2.1. Primjena heljde	5
2.2.2. Bioaktivni spojevi heljde	6
2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI	6
2.3.1. Kvercetin i derivati kvercetina	7
2.3.2. Rutin	8
2.3.3. Vezani polifenoli.....	9
2.3.3.1. <i>t-ferulinska kiselina</i>	9
2.3.3.2. <i>p-kumarinska kiselina</i>	10
2.4. EKSTRAKCIJA	11
2.4.1. Konvencionalna ekstrakcija	11
2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJAL	13
3.1.1. Biljni materijali	13
3.1.2. Kemikalije i standardi	13
3.1.3. Aparatura i pribor	16
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Određivanje udjela suhe tvari	18
3.2.2. Određivanje udjela suhe tvari ekstrakta	18
3.2.3. Priprema ekstrakta	19
3.2.3.1. <i>Konvencionalna ekstrakcija</i>	19
3.2.3.2. <i>Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima</i>	20
3.2.4. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata	21
3.2.4.1. <i>Određivanje udjela ukupnih polifenola</i>	21
3.2.4.2. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom</i>	22
3.2.4.3. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom</i>	23
3.2.4.4. <i>Određivanje udjela vezanih fenolnih spojeva</i>	24
3.2.4.5. <i>Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)</i>	25
3.2.5. Karakterizacija ugljikohidratne frakcije	26
3.2.5.1. <i>Određivanje udjela vlakana</i>	26
3.2.5.2. <i>Određivanje monomernog sastava polisaharida stanične stijenke</i>	27
3.2.6. Obrada podataka.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. POLIFENOLNA FRAKCIJA TALIJANSKOG LJULJA I SLAME HELJDE	29
4.1.1. Karakterizacija spektrofotometrijskim metodama	29

4.1.2. Udio pojedinačnih slobodnih polifenola.....	34
4.1.3. Udio vezanih polifenolnih spojeva.....	36
4.2. UGLJIKOHIDRATNA FRAKCIJA TALIJANSKOG LJULJA I SLAME HELJDE	38
4.2.1. Monomerni sastav strukturnih polisaharida	38
4.2.2 Udio prehrambenih vlakana	39
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA	43
7. PRILOZI	

1. UVOD

Poznato je da je prehrana važan čimbenik u održavanju zdravog života te je stoga i sve veći interes usmjeren na konzumaciju specifičnih prehrambenih komponenti koje mogu imati pozitivne učinke na zdravlje pojedinca. Među njima se posebno ističu polifenolni zbog svojih antioksidacijskih učinaka. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji se mogu pronaći u biljnim namirnicama, uključujući voće, povrće, čaj, kavu te imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Kao takvi su sastavni dio svakodnevne ljudske prehrane. Današnja istraživanja su, osim na dokazivanje različitih bioloških učinaka, usmjerena i na pronalazak alternativnih izvora polifenola koji se ne natječu s hranom i koji mogu poslužiti kao sirovine za njihovo izdvajanje i formuliranje u oblik različitih dodataka prehrani, a putem kojih se potencijalno može osigurati veći unos takvih spojeva. U tom smislu, potencijalno su zanimljivi i neprehrambeni izvori, primjerice lignocelulozne sirovine. Lignocelulozne sirovine podrazumijevaju biljne materijale bogate ligninom, hemicelulozom i celulozom. U konkretnom smislu, to mogu biti različiti ostaci nakon proizvodnje hrane (agro-industrijski ostaci) ili pak biljni materijal korišten u druge svrhe (prehrana životinja, ostaci drvnog materijala). Ovi materijali sve se više istražuju kao vrijedne, obnovljive i lako dostupne sirovine za proizvodnju biokemikalija, biomaterijala, bioenergije, pri čemu prefiks "bio" upravo označava njihovo podrijetlo iz lignoceluloze. U formiranju navedenih novih proizvoda, najviše se iskorištava ugljikohidratna frakcija lignoceluloznih sirovina, kao izvor energije i ugljika u postupcima fermentacije i biokonverzije. Međutim, s obzirom na biljno podrijetlo, od potencijalno važnog značaja je i istraživanje polifenolne frakcije lignoceluloznih materijala, čije izdvajanje se može integrirati s postupcima predobrade sirovine (u svrhu boljeg iskorištavanja ugljikohidratne frakcije). Time se otvara mogućnost boljeg iskorištavanja iste sirovine, kao novog izvora polifenola i kao izvora šećera.

Talijanski ljulj (*Lolium multiflorum* Lam., Poaceae) je jednogodišnja biljka koja se koristi u prehrani životinja zbog svog bogatog nutritivnog sastava. Sve je veći broj istraživanja njegove primjene u proizvodnji biogoriva, dok je polifenolna frakcija relativno neistražena.

Slama heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench) nastaje kao ostatak nakon žetve heljde za proizvodnju zrna koje se koristi za prehranu ljudi, a čine ju uglavnom suhe stabljike i listovi biljke. Slama heljde se uglavnom koristi za poboljšavanje tla ili u prehrani životinja. Zrno heljde je relativno dobro istraženo u smislu nutritivne i bioaktivne vrijednosti, a također raste broj istraživanja i na nusproizvodima heljde kao potencijalno vrijednim izvorima funkcionalnih sastojaka, prvenstveno polifenola i prehrambenih vlakana. U tom smislu su najviše istražene posije heljde, dok je stabljika heljde relativno slabo istražena.

S obzirom na navedeno, ciljevi ovog rada bili su karakterizirati polifenolnu i ugljikohidratnu frakciju talijanskog ljulja i slame heljde. Karakterizacija polifenolne frakcije provedena je određivanjem ukupnih i pojedinačnih slobodnih polifenola, antioksidacijskog kapaciteta te vezanih fenolnih spojeva. Karakterizacija ugljikohidratne frakcije provedena je određivanjem monomernog sastava strukturnih polisaharida te netopljivih i topljivih vlakana, na temelju čega su određeni udjeli celuloze, hemiceluloze i lignina.

Rezultati ovog rad doprinijet će proširenju spoznaja o bioaktivnom sastavu i sastavu ugljikohidrata ovih relativno neistraženih sirovina, čime će se dobiti bolji uvid u mogućnosti njihove valorizacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TALIJANSKI LJULJ

Talijanski ljulj (*Lolium multiflorum* Lam.) (slika 1) je jednogodišnja koja pripada porodici trava (Poaceae), a često se još naziva i mnogocvijetni ljulj te jednogodišnji ljulj. Kao usjev se često uzgaja i kao dvogodišnja biljka. Biljka sadrži cvjetne dijelove (cvat, klasić i sjeme) i vegetativne dijelove (list, stabljiku, vrat i korijen). Cvat završava stabljiku, a kod jednogodišnjeg ljulja to je pojedinačan klas, duljine 10 do 40 cm, u prosjeku oko 30 cm. Klas ima 5 do 38 naizmjenično raspoređenih klasića pričvršćenih rubom izravno na središnju os. Klasići jednogodišnjeg ljulja dugi su oko 8 do 30 mm i sadrže 10 do 20 cvjetova. Listovi su oštro zašiljeni, gornja površina je izbrazdana, a donja površina je glatka, sjajna i bez dlaka, s istaknutom središnjom žilom. Lisne ploče su široke 4 do 10 mm i dugačke 6 do 20 cm. Stabljike jednogodišnjeg ljulja visoke su od 30 do 100 cm, ovisno o sorti, vlažnosti i uvjetima na staništu. Stabljika je uglavnom blijedozelene ili žućkaste boje. Kod jednogodišnjeg ljulja, sustav korijenja vrlo je razgranat i gust, s mnoštvom vlaknastih, adventivnih korijena (Hannaway i sur., 1999).



Slika 1. Talijanski ljulj (*Lolium multiflorum*) u polju ljulja (Anonymus 1, 2024)

Ljulj je vrlo prilagodljiva biljka koja može rasti na različitim tipovima tla i podnosi različite klimatske uvjete, iako je najbolje prilagođen na područjima hladne i vlažne klime. Tolerantan je na kiselu do alkalna tla (pH 5,0 do 7,8), a najbolje raste kada se pH tla održava između 5,5 i 7,5. Temperatura optimalna za rast je između 20 do 25 °C, stoga temperaturni stres tijekom ljetnih razdoblja uzrokuje pad prinosa čak i uz dostupnu odgovarajuću količinu vode (Hannaway i sur., 1999). Samoniklo se može se pronaći na livadama, pašnjacima, uz puteve. Biološko svojstvo ljulja je da su mu cvatovi samooplodni, što znatno olakšava reprodukciju i širenje ljulja u različitim

okruženjima. Široko se uzgaja u mnogim regijama poput Europe, Amerike i Azije (Hannaway i sur., 1999).

2.1.1. Primjena talijanskog ljulja

Talijanski ljulj se najviše uzgaja za prehranu životinja te se smatra jednom od najkvalitetnijih i najproduktivnijih trava u tu svrhu (Anonymus 2, 2024). Oko 90 posto uzgojenog talijanskog ljulja u SAD-u se koristi za zimske pašnjake na jugoistoku (Hannaway i sur., 1999). Koristi se za izravnu prehranu (u zelenom stanju) te za proizvodnju sijena, sjenaže i silaže. Može se sijati samostalno ili kombinirano, najčešće s crvenom djetelinom, lucernom. Visokoproduktivna je trava s prinosnom zelene mase od 40-80 t/ha, a godišnje daje 3-6 otkosa, ovisno o primijenjenoj agrotehnici (Anonymus 2, 2024). Na kvalitetu silaže talijanskog ljulja uvelike utječe stupanj zrelosti u žetvi. Za optimalan kompromis između kvalitete i kvantitete, jednogodišnji ljulj se kosi u čim ranijoj fazi klasanja (Hannaway i sur., 1999). Osim navedenog, talijanski ljulj se može koristiti i kao pokrovni usjev između uzgoja drugih glavnih kultura, za vezanje viška dušika iz tla ili sprječavanje erozije zbog postojanja ekstenzivnog vlaknastog korijenskog sustava ili za zelenu gnojidbu. U smjesi s drugim pokrovnim kulturama, može utjecati na njihovo brže proklijavanje. Zanimljivo je da se jednogodišnji ljulj u Kini također koristi za prehranu riba. Neke vrste šarana hrane se jednogodišnjim ljuljem (Hannaway i sur., 1999).

2.1.2. Bioaktivni spojevi talijanskog ljulja

Polifenoli spojevi talijanskog ljulja relativno su slabo istraženi, a limitirani podaci ukazuju da talijanski ljulj sadrži fenolne kiseline, flavonoide, antocijane i hlapljivo ulje koji mogu djelovati antimikrobno prema nekim patogenim bakterijama (Choi i sur., 2017; Valan Arasu i sur., 2014). Choi i suradnici (2016) utvrdili su da polifenolne frakcije talijanskog ljulja sadrže kafeinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu, miricetin i kemferol kao glavne aktivne komponente. U uzgoju životinja, Dohi i suradnici (1997) utvrdili su da neke komponente talijanskog ljulja mogu imati stimulativno djelovanje pri uzgoju ovaca u smislu poboljšanja unosa hrane i povećanja zdravstvene dobrobiti. (Dohi i sur., 1997)

2.2. HELJDA

Unutar roda *Fagopyrum* (Polygonaceae) uzgajaju se dvije vrste, *Fagopyrum esculentum* Moench (obična heljda) i *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn (tatarska heljda) (Adachi i sur., 1983). U ovom radu fokusirati ćemo se na *Fagopyrum esculentum* Moench, koja čini 90 % svjetske proizvodnje heljde (slika 2). Heljda pripada pseudožitaricama, dikotiledonim kulturama koje nisu srodne

žitaricama ali, njihove sjemenke dijele sličnosti s žitaricama u smislu sličnog izgleda i visokog udjela škroba u sjemenkama (Aleksseeva i sur., 1992; Bugg i sur., 1989). Heljda je uspravna jednogodišnja biljka s jednom glavnom stabljikom i grančastim habitusom. Stabljike su šuplje i podložne lomljenju. Biljke uglavnom narastu do 0,6-1,3 m visine. Korijenski sustav čini kratak glavni korijen i fino bočno korjenje (Esser 1953; Marshall 1969). Listovi heljde su trokutasti, a cvjetovi su bijeli ili ružičasti i obično se formiraju u grozdovima na vrhu stabljike. Nakon oprašivanja, cvjetovi se pretvaraju u plodove koji sadrže sjemenke heljde. Sjemenke heljde su male i trokutaste te se koriste u prehrani ljudi (Alvarez-Jubete i sur. 2010).



Slika 2. *Fagopyrum esculentum* Moench (Anonymus 3, 2024)

Heljda se tradicionalno uzgaja u mnogim dijelovima svijeta, posebno u dijelovima Azije, od kud potječe, i istočne Europe (Aleksseeva i sur, 1992). Najveći proizvođači heljde su Kina, Ruska Federacija, Ukrajina i Francuska. Svjetska proizvodnja u 2022. bila je 2,2 milijuna tona uzgojenih na 2,2 milijuna hektara (FAOSTAT, 2024).

2.2.1. Primjena heljde

Zrno heljde se koristi za prehranu ljudi, kao cjelovito ili u obliku brašna i krupica (Aleksseeva ES. I sur., 1992). Proizvodi od heljde najčešće obuhvaćaju tjestenine, kaše, kruh, palačinke, klice za salate i smoothieje, pa čak i pića (Kreft i sur., 2020). Heljda je također važna i za održivu poljoprivredu jer može poboljšati plodnost tla i smanjiti potrebu za korištenjem pesticida i herbicida. Stoga se uzgaja i kao usjev u rotaciji u mnogim organskim i održivim poljoprivrednim sustavima. Slama heljde predstavlja nusproizvod u proizvodnji heljde, a čine ju uglavnom suha stabljika i listovi heljde. Ovaj materijal često se koristi u organskom vrtlarstvu i kao materijal za pakiranje ili punjenje. Također se može koristiti za prehranu stoke ili za dobivanje energije spaljivanjem (Kolpak, 2014).

2.2.2. Bioaktivni spojevi heljde

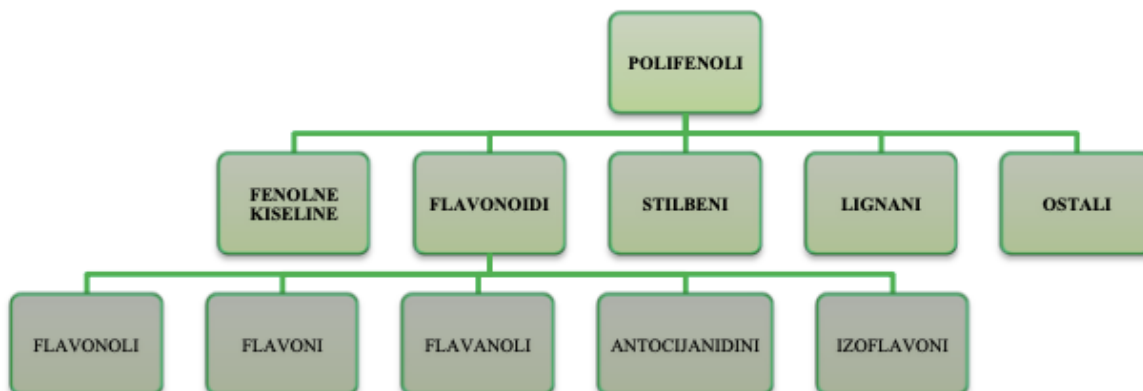
Heljda je nutritivno izuzetno kvalitetna namirnica, bogata proteinima, vlaknima, vitaminima i mineralima (Alvarez-Jubete i sur. 2010). Također je bogata antioksidansima poput rutina, koji su povezani s različitim zdravstvenim koristima. Osim rutina, sadrži i kvercetin, katehin i klorogensku kiselinu, koji imaju antioksidativna, protuupalna i antikancerogena svojstva. Sadrži također, vitamine B kompleksa i minerale poput mangana, magnezija i bakra, koji su važni za metabolizam. Heljda je dobar i važan izvor vlakana, koja mogu imati dobrobit na zdravlje cijelog probavnog sustava (Inglett i sur. 2011). Poznato je da heljda ne sadrži gluten, pa je pogodna za konzumiranje od strane oboljelih od celijakije. Sadrži dobro uravnotežen sastav aminokiselina s visokim koncentracijama lizina i arginina u usporedbi sa žitaricama (Christa, K. i Soral-Šmietana, 2008). Ove su kvalitete posljednjih godina povećale potražnju za heljdom i privukle pozornost znanstvene zajednice.

Od nusproizvoda heljde, najviše se istražuje posije heljde (Ma i sur., 2023) kao potencijalna sirovina za izdvajanje bioaktivnih sastojaka, najviše flavonola, dok su istraživanja slame heljde u tom smislu vrlo limitirana.

2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka, a u prirodi je identificirano više od 8000 različitih vrsta. Oni pripadaju fenilpropanoidima te sadrže barem jednu aromatsku jezgru i jednu ili više hidroksilnih skupina (Di Lorenzo i sur., 2021). Zahvaljujući svojoj kemijskoj strukturi, polifenoli su prepoznati kao snažni antioksidansi i igraju ključnu ulogu u prevenciji negativnih posljedica oksidativnog stresa te imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Annunziata i sur., 2020). Glavni izvori polifenola su razne vrste voća i povrća, zeleni i crni čaj, voćni sokovi, kava, crno vino, sjemenke, žitarice i orašasti plodovi. Visoke koncentracije polifenola se također mogu pronaći u raznim začinima i aromatičnom bilju poput kurkume, celera, peršina, mente, ružmarina, timijana, kadulje, đumbira, itd. (Brglez Mojzer i sur., 2016). Polifenolni spojevi se, s obzirom na svoju kemijsku strukturu, obično dijele u nekoliko glavnih podskupina: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, lignani i ostali spojevi (slika 3). Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu polifenola, a oni se dodatno dijele na pet podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni (slika 3). Polifenolni spojevi se u biljkama često nalaze u konjugiranom obliku s jednim ili više ostataka šećera, karboksilnih ili organskih kiselina, amina, lipida ili fenolnih skupina (Kondratyuk i Pezzuto, 2004). Konjugirani oblici, posebice flavonoida, predstavljaju njihov najzastupljeniji oblik u prirodnim izvorima. U nutritivnom smislu, bioraspoloživost polifenola značajno ovisi o njihovoj

kemijskoj strukturi i u tom smislu aglikoni flavonoida imaju veću bioraspoloživost u odnosu na konjugirane oblike- glikozide (Singla i sur., 2019).

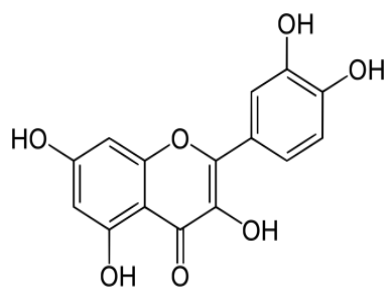


Slika 3. Podjela polifenolnih spojeva (prema Olivares-Vicente i sur., 2018; D'Archivio i sur., 2008)

2.3.1. Kvercetin i derivati kvercetina

Kvercetin spada u podskupinu flavonoida, flavonole (Manach i sur., 2004).

Struktura kvercetina (slika 4) sastoji se od dva aromatična prstena povezana heterocikličkim prstenom koji sadrži kisik (Lee i sur., 2020).



Slika 4. Kemijska struktura kvercetina (Anonymus 4, 2024)

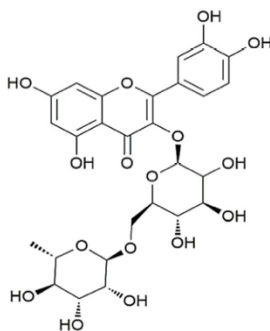
Kvercetin se smatra najzastupljenijim flavonolom u ljudskoj prehrani te ima snažna antioksidativna svojstva. Osim toga, ima protuupalna, antibakterijska i antikancerogena svojstva. Najveće količine kvercetina sadrže namirnice poput brusnice i luka (0,3 mg/g svježe mase), zeleni čaj i crno vino (10-25 mg/L) (Brglez Mojzer i sur., 2016; Semwal i sur., 2016; Calderon-Montano i sur., 2011). Kvercetin je dostupan i kao dodatak prehrani, a preporučena dnevna doza unosa je 200-1200 mg (Harwood i sur., 2007). Kvercetin se u biljnim izvorima nalazi uglavnom u

glikoziliranim oblicima prvenstveno kao β -glikozid različitih šećera (Lee i Mitchell, 2012). Zbog toga je bioraspoloživost kvercetina iz prehrambenih izvora relativno niska, a pritom je upravo glikozilacija jedan od najutjecajnijih faktora. Također, antioksidacijska svojstva kvercetina i njegovih konjugiranih oblika, mogu biti različita, izravno proporcionalno broju slobodnih hidroksilnih skupina (Lesjak i sur., 2018).

Za ekstrakciju kvercetina iz biljnih materijala najčešće se koriste otapala poput metanola, acetona i etanola različitih % v/v (Dmitrienko i sur., 2012).

2.3.2. Rutin

Rutin (rutozid, kvercetin-3-rutinozid, kvervetin-3-ramonzilglukozid), glikozidni je oblik kvercetina u kojem je na molekulu kvercetina vezan disaharid rutinoza (Kreft i sur., 1999) (slika 5).



Slika 5. Kemijska struktura rutina (Das i sur., 2018)

Rutin je jedan od bioaktivnih flavonoidnih spojeva, koji su prisutni u značajnim količinama u biljkama. Rutin je otkriven u 73 različita voća i povrća, a noni, kupina, dunja i trešnja su voće s najvećim udjelom rutina (između $43,2 \text{ mg kg}^{-1}$ i $162,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Među povrćem, najviši udjeli određeni su u korijanderu ($196,6 \text{ mg kg}^{-1}$) i šparogama ($151,3 \text{ mg kg}^{-1}$). Uzimajući u obzir porcije koje se normalno konzumiraju, povrće predstavlja glavni izvor unosa rutina u ljudskoj prehrani (Damin i sur., 2019).

Istraživanja su pokazala da rutin ima širok raspon bioloških aktivnosti (Yangi sur., 2004), uključujući antioksidativno i protuupalno djelovanje. Na potencijalne zdravstvene dobrobiti rutina utječe količina koja se konzumira i njegova bioraspoloživost.

Rutin se iz biljnog materijala može ekstrahirati različitim metodama, od konvencionalnih do inovativnih tehnika kao što su ultrazvuk, mikrovalovi, infracrveno zračenje, primjenom visokog tlaka ili superkritičnih fluida. Međutim, pravilna usporedba između metoda vrlo je teška zbog

varijacije u podrijetlu biljke i uvjetima ekstrakcije. Važno je optimizirati metodu ekstrakcije kako bi se dobio visok prinos i prihvatljiva čistoća rutina (Chua, 2013).

2.3.3. Vezani polifenoli

2.3.3.1. *t-ferulinska kiselina*

Ferulinska kiselina (4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina) je fenolna kiselina koja sadrži fenilne, hidroksilne i karboksilne skupine, etilensku vezu i benzenski prsten (metoksi i fenil hidroksilne skupine znatno povećavaju njezinu elektrofilnu reaktivnost) (Wang i sur., 2003).

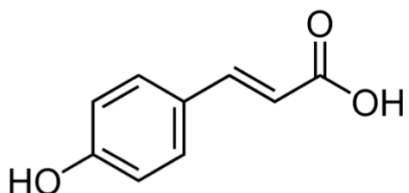
Ferulinska kiselina (engl. *ferulic acid*, FA) je iznimno obilan i gotovo sveprisutan derivat cimetine kiseline, prisutan u komponentama stanične stijenke biljaka kao kovalentni bočni lanci (Rosazza i sur., 1995). Zajedno s dihidroferulinskom kiselinom, sastavni je dio lignoceluloze, gdje daje čvrstoću staničnim stijenkama stvaranjem poprečnih veza između polisaharida i lignina. Upravo prisutnost FA unutar biljnih materijala glikozidnih konjugata, estera i amida otežava njezinu izravnu izolaciju (Tilay i sur., 2008).

FA se može pronaći i u travama, žitaricama, povrću, cvijeću, voću, lišću, grahu, sjemenkama kave i orašastim plodovima. Ima antioksidativno, antimikrobno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje, a djeluje i protiv tromboze, i inhibira ekspresiju nekih citotoksičnih enzima (Mancuso i Santangelo, 2014; Ou i Kwok, 2004). Ima dobru sposobnost apsorpcije i brzo se izlučuje kod životinja i ljudi, već 1,5 h nakon uzimanja (Rondini i sur., 2002), zbog čega se smatra niskotoksičnom. Ipak, klinička uporaba ferulinske kiseline ostaje diskutabilna zbog njene niske biorasploživosti (Mancuso i Santangelo, 2014). Štoviše, primjena ferulinske kiseline u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji ograničena je njezinom niskom hidrofobnošću, hidrofilnošću i stabilnošću u različitim sustavima otapala (Compton i sur., 2012). U nedavnoj studiji, Ou i sur., (2004) koristili su kukuruzni škrob i ferulinsku kiselinu za sintetiziranje škrobnog ferulata. Otkrili su da je škrobni ferulat samo djelomično hidroliziran (manje od 10%) pomoću diijastaze, a vezanu ferulinsku kiselinu uvelike su oslobodili mikroorganizmi debelog crijeva. Time su neki derivati ferulinske kiseline pokazali veću biološku aktivnost od slobodnog oblika.

Kod ekstrakcije FA vrlo je bitna optimizacija kritičnih parametara za izolaciju, kao što su vrijeme, pH i temperatura koji su ujedno i ključni za visok prinos. FA je netopljiva u vodi na sobnoj temperaturi, ali je topiva u vrućoj vodi, etil acetatu, etanolu i etil eteru, a Kumar i Pruthi (2014) su svojom studijom utvrdili da je etanol (60%) prikladan za uspješnu ekstrakciju FA.

2.3.3.2. *p*-kumarinska kiselina

p-kumarinska kiselina (*p*-CA), fenolna kiselina iz skupine hidroksicimetnih kiselina (4-hidroksicimetna kiselina), sintetizira se kroz šikiminski put s fenilalaninom i tirozinom kao prekursorima. U prirodi se pojavljuje u tri izomera (orto-, meta- i para-). Na slici 6. prikazana je kemijska struktura *p*-kumarinske kiseline. *p*-CA igra središnju ulogu u sekundarnom metabolizmu biljaka jer se naknadno može transformirati u fenolne kiseline (npr. kafeinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu, klorogensku kiselinu i sinapinsku kiselinu), flavonoide, prekursore lignina i druge sekundarne metabolite (El-Seedi i sur., 2012).



Slika 6. Kemijska struktura *p*-kumarinske kiseline (Boo, 2019)

p-CA se nalazi u biljkama i gljivama u slobodnom ili vezanom obliku. Slobodna ili vezana *p*-CA široko je rasprostranjena u voću (npr. jabuke, kruške, grožđe, naranče, rajčice i bobičasto voće), povrću (npr. grah, krumpir i luk) i žitaricama (npr. kukuruz, zob i pšenica). U vezanom obliku, *p*-CA može biti topljiva i netopljiva. Topljivi oblici, osim slobodne *p*-kumarinske kiseline, podrazumijevaju estere s malim molekulama, poput alkohola, amina, ili glikozide sa monosaharidima i oligosaharidima. Netopljivi oblici podrazumijevaju esterski vezanu ferulinsku kiselinu s polisaharidima stanične stijene i ligninom ili eterski vezanu ferulinsku kiselinu za lignin (Sun i sur., 2005; Sun i sur., 2001). U biljnim izvorima, slobodni oblici *p*-CA relativno su malo zastupljeni, ovisno o biljnoj vrsti, dok se u nekim gljivama, poput *Ganoderma lucidum*, *Termitomyces heimii*, *Ganoderma lucidum* i *Cantharellus cibarius*, *p*-CA može naći iznčajnije zastupljena. Zanimljivo je da konjugati *p*-CA pokazuju veću zastupljenost i snažnije biološke aktivnosti od slobodnog *p*-CA (Pei i sur., 2016). Pei K. i sur. (2016) su utvrdili da je razlog veće biološke aktivnosti derivata kumarinske kiseline sporija apsorpcija u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta, te zato većina dospjeje u debelo crijevo, dok se slobodna *p*-kumarinska kiselina lako i brzo apsorbira u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta i izlučuje urinom.

Vodotopivi konjugati *p*-CA mogu se ekstrahirati pomoću vode ili vodene otopine etanola, često i uz dodatak male koncentracije kiseline. Esterificirani dio *p*-CA oslobađa se saponifikacijom, dok se eterificirani dio *p*-CA (glikozidi) oslobađa kiselinskom hidrolizom.

2.4. EKSTRAKCIJA

Prvi korak u identifikaciji i kvantifikaciji polifenolnih spojeva iz nekog biljnog materijala je ekstrakcija. Ekstrakcija podrazumijeva separaciju ciljnih komponenti biljnog koristeći pritom selektivno otapalo (Xu i sur., 2017). Odabir ekstrakcijske metode ovisi o raznim čimbenicima, primjerice svojstvima biljnog materijala te ciljanim spojevima (Azmir i sur., 2013). Glavne parametre ekstrakcije čine: vrsta otapala, svojstva uzorka (veličina čestica i sl.), omjer uzorka i otapala, temperatura, vrijeme i tlak pri kojima se provodi ekstrakcija (Azmir i sur., 2013). Primjerice, s obzirom na princip "slično otapa slično", odabir otapala ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima ciljanih spojeva. Manje veličine čestica uzorka pospješuju ekstrakciju zbog veće kontaktne površine između uzorka i otapala na kojoj se odvija prijenos mase (Xu i sur., 2017).

2.4.1. Konvencionalna ekstrakcija

Većina konvencionalnih ekstrakcija temelji se na ekstraktibilnoj snazi različitih otapala, uz primjenu topline i/ili miješanja. Neke od konvencionalnih metoda ekstrakcije koje se najčešće koriste su maceracija, dekokcija i infuzija.

Maceracija je široko primjenjena i jeftina metoda ekstrakcije različitih bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala. U ovom postupku, usitnjeni kruti materijal se miješa s prikladnim otapalom i ostavlja kroz duže vrijeme (od nekoliko sati do nekoliko dana) u zatvorenom posudi i pri sobnoj temperaturi, uz povremeno protresanje (Handa i sur., 2008).

Dekokcija je metoda ekstrakcije koja je pogodna za sastojke topljive u vodi, te sastojke koji se neće degradirati pod utjecajem topline. Postupak se provodi namakanjem biljnog materijala u određenom volumenu otapala (najčešće vodi) koje se zagrijava na visoku temperaturu (obično temperature ključanja otapala ili veću uz primjenu nadtlaka (Azwanida, 2015; Handa, 2008). Infuzija je postupak namakanja biljnog materijala u hladnom ili toplom otapalu kraće vrijeme (Azwanida, 2015; Handa, 2008).

Glavni nedostatak konvencionalnog načina ekstrakcije je dugo vrijeme ekstrakcije, gubitak otapala uslijed evaporacija, degradacija termolabilnih spojeva i nemogućnost postizanja visoke selektivnosti ekstrakcije (Luque de Castro i Garcia-Ayuso, 1998). Danas se stoga intenzivno istražuju inovativne tehnike ekstrakcije kako bi se povećala učinkovitost i selektivnost postupka te smanjila primjena toksičnih otapala. Neki primjeri inovativnih ekstrakcija su ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ultrazvukom, mikrovalovima, pulsirajućim električnim poljem (PEP) i superkritičnim tekućinama (Dragović-Uzelac i sur., 2012).

2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima spada u inovativne metode ekstrakcije, te koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s uzorkom, s ciljem lakšeg prelaska željenih komponenti iz uzorka u otapalo (Eskilsson i Bjorklund, 2000), a kao prednost ove tehnike se ističe smanjeno vrijeme ekstrakcije i smanjena potrošnja otapala (Delazar i sur., 2012). Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi smješteni između X-zraka i infracrvenog zračenja, frekvencije 300 MHz - 300 GHz tj. valne duljine između 1 mm i 1m. Elektromagnetski val je periodična promjena električnog i magnetskog polja koji titraju u fazi. Za zagrijavanje molekula otapala odgovoran je fenomen ionske kondukcije i dipolne rotacije, te oni uglavnom djeluju simultano. Ionska kondukcija predstavlja migraciju iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Uslijed otpora otopine s obzirom na migraciju iona, dolazi do trenja i razvoja topline, odnosno zagrijavanja same otopine. Dipolna rotacija je karakterizirana ubrzanom rotacijom dipolnih molekula u promjenjivom električnom polju (Eskilson i Bjorklund, 2000). Zagrijavanje biljnog materijala u otapalu, pomoću mikrovalova, dovesti će do isparavanja vode koja se nalazi unutar biljne stanice, što stvara veliki pritisak na staničnu stijenku biljke te u konačnici to dovodi do pucanja stijenke, prilikom čega ciljane komponente prelaze u otapalo.

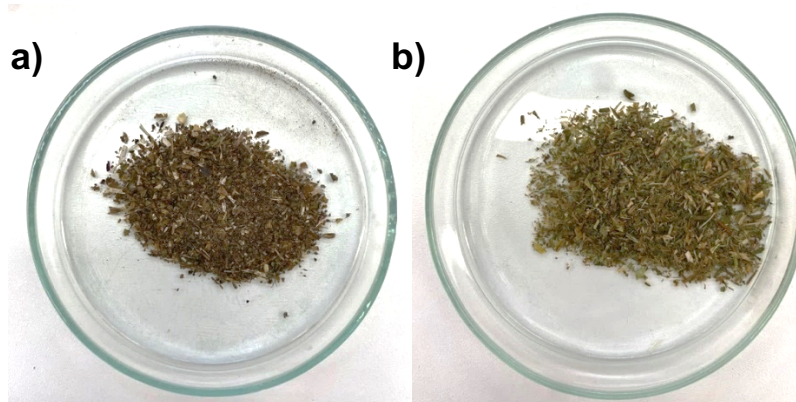
Učinkovitost mikrovalne ekstrakcije ovisit će o svojstvima poput volumena otapala, snazi mikrovalova i odabranoj temperaturi (Satyajit i sur., 2010). Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju sastoji se od četiri glavne komponente, a to su generator mikrovalova, vodič valova, ekstrakcijska posuda i cirkulator. Izbor otapala ovisi o interakcijama između uzorka i otapala, topljivosti uzorka i sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalove. Na prinos ekstrakcije utječe i ekstrakcijsko vrijeme, snaga mikrovalova i svojstva uzorka. S obzirom na različite čimbenike koji imaju utjecaj na prinos, proces je poželjno optimizirati za odabrani uzorak i otapalo, kako bi se dobili pouzdanimi rezultati (Jukić i sur., 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljni materijali

U ovome radu korištena su 2 biljna materijala – uzorak talijanskog ljulja (*Lolium multiflorum* Lam.) i slame heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench.). Uzorci su sakupljeni tijekom rujna/listopada 2023. godine na području Varaždinske županije, u okolici Ludbrega. Oba uzorka predstavljaju uzgojene kulture; pritom je uzorak talijanskog ljulja izuzet iz otkosa za hranidbu životinja, dok uzorak slame heljde nakon žetve heljde u svrhu proizvodnje zrna za ljudsku prehranu. Prikupljeni uzorci su sušeni na zraku, zaklonjeni od izravne sunčeve svjetlosti, a nakon toga su samljeveni u frakciju veličine 4 mm i naknadno u mlinčiću za kavu za kućanstvo što je dodatno smanjilo prosječnu veličinu frakcije za približno dva puta (slika 7 a i b). Tako pripremljeni uzorci spremljeni su u *zip-lock* vrećice i čuvani na suhom i tamnom mjestu.



Slika 7. Uzorci *Lolium multiflorum* Lam. (a) i *Fagopyrum esculentum* Moench. (b) (vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije i standardi

Priprema ekstrakata i frakcija polifenolnih spojeva

- Aceton, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 % (v/v), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- L-askorbinska kiselina, Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- n-heksan, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Kompleksal III (etilendiaminotetraoctena kiselina, dinatrijeva sol, dihidrat), T. T. T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)

- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Natrijev hidroksid u zrnima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev sulfat, bezvodni, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela suhe tvari

- Pijesak – opran i žaren, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, RH)

Određivanje udjela ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens, Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Češka)
- Galna kiselina (> 97 %), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Natrijev karbonat, Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Češka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH i ABTS metodama

- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Etanol 96 % (v/v), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev peroksodisulfat, Honeywell Fluka (Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD)
- Metanol, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva (HPLC-DAD)

- Acetonitril, HPLC grade, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Analitički standardi bioaktivnih spojeva:
 - rutin
 - kvercetin
 - *t*-ferulinska kiselina
 - *p*-kumarinska kiselina
 - *t*-sinapinska kiselina
- Mravlja kiselina, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Demineralizirana voda HPLC kvalitete ($\leq 5 \mu\text{S}$)

Određivanje udjela vlakana velike molekulske mase

- Enzimsko-gravimetrijski set za određivanje vlakana (K-INTDF), Megezyme (Bray, Irska)
- Aceton, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Pomoćno filtracijsko sredstvo Celite® 545 AW, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

- Octena kiselina, Kefo d.o.o. (Sisak, Hrvatska)
- Trizma® Base (Sigma cat. no. T-1503), Sigma-Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Etanol (96 %-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Maleinska kiselina, Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Njemačka)
- Natrijev hidroksid u zrnima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela proteina

- Borna kiselina, Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)
- Indikatori:
 - brom-krezol zeleno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
 - metil crveno, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selena), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, 0,1 N, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Sumporna kiselina (96 %-tna), Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)

Određivanje monomernog profila polisaharida

- 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP reagens) (M70800 Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Natrijev hidroksid 1M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Klorovodična kiselina 1M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Kloroform, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev karbonat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Acetonitril, HPLC grade, Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, SAD)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, Acros Organics (New Jersey, MA. SAD)
- Natrijev dihidrogenfosfat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Sumporna kiselina 2,5 M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Sumporna kiselina, konc., Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Fosforna kiselina 85 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Analitički standardi:
 - D-(+)-manoza, D-(+)-galaktoza, D-(-)-ksiloza, D-(+)-arabinoza and L-(+)-ramnoza monohidrat; LGC Standards (Teddington, UK)
 - D-(+)-glukoza monohidrat, Fluka (Buch, Switzerland).

- L-(-)-fukoza, Acros Organics (Geel, Belgium)
- D-(+)-galakturonska kiselina, D-glukuronska kiselina, D-(-)-riboza; Sigma-Aldrich/Merck (SAD)

3.1.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga New Classic ML204/01, Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Automatske pipete, Gilson (Francuska)
- Centrifuga SL 8R s rotorom s utorima pod fiksnim kutom, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, SAD)
- Termometar
- Stakleno posuđe: boca za odsisavanje, odmjerne tikvice (5, 10, 25, 50, 100 mL), Duran staklene boce (100, 250, 500 mL), eksikator sa sredstvom za sušenje, HPLC vial s čepovima sa septom, Dimroth hladilo, tikvice s okruglim dnom (50, 100 mL), staklene epruvete 12 mL, filter lončići s dnom od sinteriranog stakla poroziteta G3 (15-40 μ m; 50 mL), stakleni adapter za filter lončiće, stakleni lijevci, menzure (25, 50, 100 mL), pipete (2, 5, 10 mL), epruvete s čepovima na navoj s PTFE brtvom (14 mL), laboratorijske čaše (100, 150, 250, 500 mL), Erlenmeyerove tikvice (250 mL), bireta (50 mL)
- Plastično posuđe: Falcon epruvete s konusnim dnom (15, 50 mL), Pasteur pipete (2 mL),
- Ostalo posuđe i pribor: Büchnerov lijevak (φ = 50 mm), guko brtve, filter papir Whatman No.1 (φ = 50 mm), magnetići, metalne špatule, plastične i metalne žlice, laboratorijska pinceta, staničevina, jednokratne šprice (2 mL), kvarcni pijesak, mikrofilteri (Chromafil Xtra RC-20/13, 0.20 μ m; Macherey-Nagel, Njemačka), Aluminijske posudice (φ = 50 mm), s poklopcem, bunsen plamenici
- Kjeldah kivete za digestiju (500 mL), FOSS (Haganäs, Sweden)
- Kromatografski sustav Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD)
- Poluautomatska aparatura za određivanje dušika prema Kjeldalu, Kjeltex TM 2100, FOSS (Haganäs, Sweden)
- Tehnička vaga tip 1111, Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- Termoblok za digestiju uzoraka s odgovarajućim nastavkom za odsis para, Digestion system 6, 1007 Digester, Tecator (Hillerød, Danska)
- Laboratorijski sušionik ST-06, Instrumentaria d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Kromatografske kolone:

- Zorbax Extend-C18 (4,6 × 250 mm, 5 μm), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Kinetex Biphenyl (4,6 x 150 mm, 2,6 μm), Phenomenex (Torrance, CA, SAD)
- Zorbax Hi-Plex Ca (7,7 x 300 mm, 8 μm), Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Magnetska miješalica s grijačima SMHS 6, Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Spektrofotometar Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, SAD)
- Vakuumska pumpa IKA VACSTAR digital, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Njemačka)
- Vodena kupelj (Inko VKZ ERN), Inkolab d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Rotacijski vakuum uparivač IKA RV8 IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Njemačka)
- Uređaj za ekstrakciju mikrovalovima Ethos X, Milestone s.r.l. (Soriso, Italija)
- Termoblok HB120-S, DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Stolna centrifuga za epruvete 1,5 - 2 mL DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)
- Kriomlin, Retsch GmbH (Haan, Njemačka)
- Mufolna peć tip Heraeus KR-170, W.C. Heraeus GmbH (Hanau, Njemačka)
- Laboratorijska vaga preciznosi 0,01g, GF- 3000 EC; A&D Instruments (Tokio, Japan)
- pH metar (FiveEasy FE20), Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Laboratorijska tresilica Certomat RM, Sartorius (Göttingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (S 60 H) Elmasonic, Elma (Singen, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda UW3100 (promjera 3 mm); Bandelin Electronic (Berlin, Njemačka)
- pH indikatorske trakice 0-14, LLG Labware (Meckenheim, Germany)
- Stolna centrifuga za Eppendorf epruvete od 1,5 i 2 mL
- Uljna kupelj s miješanjem HBR 4 control, IKA (Staufen, Njemačka)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela suhe tvari

Za određivanje udjela vode u uzorcima slame heljde i talijanskog ljujla korištena je metoda sušenja do konstantne mase pri 105 °C. Ovim postupkom određuje se udio vode indirektno, pri čemu se mjeri ostatak koji zaostaje nakon sušenja, a iz razlike u masi prije i nakon sušenja uzorka izračunava se udio vode.

Postupak:

Za sušenje se koriste aluminijske posudice (promjera 50 mm i visine 30 mm) s poklopcem, koje se prethodno suše u sušioniku pri 105 °C tijekom 30 minuta, a zatim hlade do sobne temperature u eksikatoru i važu s točnošću od 4 decimale. U posudice se precizno odvažuje uzorak u količini od 0,5 g (s točnošću ±0,0050 g). Otklopljene posudice s odvaženim uzorkom suše se u sušioniku tijekom 1 h. Potom se posudice s uzorkom hlade u eksikatoru do sobne temperature i važu s točnošću od 4 decimale. Postupak sušenja i vaganja se ponavlja dok se ne postigne ustaljena vrijednost suhog uzorka (±0,0005 g).

Postotak suhe tvari izračuna se prema jednadžbi [1]:

$$\% s. tv. = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_1 - masa uzorka (g)

m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

Određivanje udjela suhe tvari u uzorku provedeno je u paraleli.

3.2.2. Određivanje udjela suhe tvari ekstrakta

Postupak:

Postupak je jednak postupku određivanja udjela suhe tvari u uzorku, uz iznimku sušenja uz dodatak kvarcnog pijeska kako bi se spriječio gubitak tekućeg uzorka. U osušenu i izvaganu posudicu s kvarcnim pijeskom otpipetira se 15 mL ekstrakta te se izvažuje masa tekućeg uzorka. Posudica se suši tijekom 2 h pri 105 °C, zatim hladi u eksikatoru do sobne temperature i važe s točnošću od 4 decimale. Postupak sušenja i vaganja se ponavlja dok se ne postigne ustaljena vrijednost suhog uzorka (±0,0003 g).

Postotak suhe tvari ekstrakta izračuna se prema jednadžbi [2]:

$$\% s. tv. ekstrakta = \frac{m_3 - m_2}{V_{al}} \times \frac{V_{uk}}{m_1} 100 \quad [2]$$

m_1 - masa uzorka korištenog za pripremu ekstrakta (g)

m_2 - masa aluminijske posudice s tekućim uzorkom (ekstraktom) prije sušenja (g)

m_3 - masa aluminijske posudice s tekućim uzorkom (ekstraktom) nakon sušenja (g)

$V_{al.}$ - volumen alikvota tekućeg uzorka

$V_{uk.}$ - ukupni volumen ekstrakta

3.2.3. Priprema ekstrakta

3.2.3.1. Konvencionalna ekstrakcija

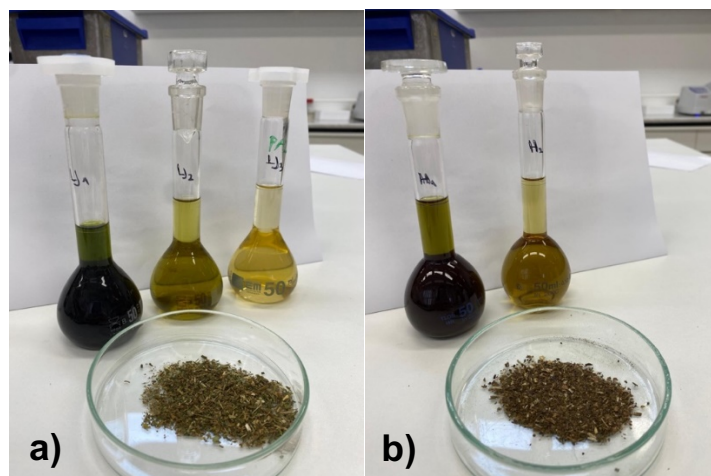
Konvencionalna ekstrakcija provedena je primjenom demineralizirane vode te hidroalkoholne otopine u 2 različite koncentracije etanola: 40 % (v/v) i 80 % (v/v).

Postupak:

Uzorak se pomiješa s otapalom u omjeru 1:20 w/v (približno 1,5 g uzorka i 30 mL otapala) u tikvici s okruglim dnom te se doda magnetič. Tikvica se uroni u kupelj zagrijanu na 80 °C, postavljenu na magnetsku miješalicu, te se postavi hladilo iznad tikvice u svrhu kondenzacije otapala. Ekstrakcija se provodi tijekom 30 min uz kontinuirano miješanje i zagrijavanje. Nakon provedene ekstrakcije, tikvica se odvoji od hladila i ohladi u kupelji s hladnom vodom, a potom se sadržaj tikvice profiltrira na Buchnerovom lijevku preko Whatman No.1 filter papira. Filtrat (ekstrakt) se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni do oznake. Ekstrakcije primjenom različitih otapala (H₂O, 40 % etoh i 80 % etoh) provedene su na jednak način, kako je opisano, u duplikatu.

Kod ekstrakcije s 80 %-tnim etanolom, nakon pripreme ekstrakta, čvrsti ostatak je ekstrahiran još 2 puta na jednak način. Pritom, čvrsti ostatak je pažljivo odvojen od filter papira, stavljen ponovo u tikvicu te je dodana porcija svježeg otapala (1:20 w/v). Ekstrakcija se provodila tijekom 30 min pri 80 °C te uz konstantno miješanje. Ekstrakti nakon 2. i 3. ekstrakcije pripremljeni su na jednak način, u odmjernoj tikvici od 50 mL. Pripremljeni ekstrakti prikazani su na slici 8.

Nakon provedene 3 uzastopne ekstrakcije, čvrsti ostatak ispran je 3 puta s 30 mL etanola (96 %) te jednom s 30 mL acetona te ostavljen u Falcon epruveti (50 mL) prekrivenoj sa staničevinom u digestoru preko noći kako bi isparilo otapalo. Tako je pripremljen uzorak alkoholno-netopljivog ostatka talijanskog ljujla i slame heljde, koji je dalje korišten u analizi vezanih fenolnih spojeva i u analizi monomernog sastava polisaharida.



Slika 8. Pripremljeni 80 % EtOH ekstrakti uzorka talijanskog ljulja (a) i slame heljde (b) nakon trostruke uzastopne ekstrakcije (*vlastita fotografija*)

3.2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (microwave assisted extraction-MAE) provedena je uz primjenu 80 %-tnog etanola, kao jednostruka ekstrakcija. Uzorci su vagani (približno 0,75 g) u posebne teflonske posude (epruvete) za ekstrakciju, a zatim je dodano otapalo (15 mL) i odgovarajući magnetič. Posude su pričvršćene unutar posebnih držača koji se umeću u postolje unutar kućišta uređaja za mikrovalnu ekstrakciju (slika 9). Parametri ekstrakcije mikrovalovima podešeni su kako slijedi:

- faza 1) trajanje: 3 min; snaga: 750 W; temperatura: 80 °C; ventilacija: 1; miješanje: da
- faza 2) trajanje 3 ili 9 min; snaga: 250 W; temperatura: 80 °C; ventilacija: 1; miješanje: da
- faza 3) trajanje 3 min; snaga: 0 W; temperatura: 20 °C; ventilacija: 3; miješanje: da
- hlađenje: 1 min

Ekstrakcija je provedena uz trajanje u fazi 2 (izotermna ekstrakcija) od 3 min ili 9 min. Nakon ekstrakcije, tekući ekstrakt je kvantitativno izdvojen filtracijom preko filter papira te nadopunjen do 25 mL s istim otapalom, u odmjernoj tikvici. Ekstrakti za oba uzorka i pri oba vremena izotermne ekstrakcije pripremljeni su u duplikatu.



Slika 9. Unutrašnjost uređaja za mikrovalnu ekstrakciju s postavljenim uzorcima unutar držača umetnutih u postolje (vlastita fotografija)

3.2.4. Karakterizacija bioaktivnog sastava ekstrakata

3.2.4.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Korištena je Folin-Ciocalteu metoda prema originalnom radu Singleton i suradnika (1999) .

Princip metode:

Metoda se temelji na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim agensom. U lužnatom mediju dolazi do formiranja fenoksid iona u strukturi polifenola, koji reduciraju Folin-Ciocalteu reagens (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline), do plavo obojenih volframova i molibdenova oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski.

Postupak:

U staklene epruvete se otipeptira 3,95 mL vode, zatim 250 μL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog s dvostrukim volumenom vode) i 50 μL uzorka. Otopina se vorteksira te se doda 750 μL otopine natrijevog karbonata (20 % w/v) i ponovo vorteksira. Reakcijska smjesa se ostavi stajati u tami tijekom 1 h i pri sobnoj temperaturi. Po isteku vremena, intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se na spektrofotometru pri 765 nm i uz slijepu probu koja umjesto uzorka sadržava jednaki volumen demineralizirane vode. Po potrebi se reakcija provodi s razrijeđenim uzorkom (ukoliko apsorbancija premašuje najvišu koncentraciju standarda). Reakcija je provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izračun rezultata:

Za izradu baždarne krivulje koristi se standard galne kiseline koja se pripremi u sljedećim koncentracijama 100, 200, 400, 600 i 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Provede se reakcija za svaku koncentracijsku

točku prema gore opisanom postupku te se izmjeri vrijednost apsorbancije pri 765 nm. Konstruira se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Jednadžba baždarnog pravca za reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom, uz standard galne kiseline, glasi [3]:

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

gdje je:

$$y = \Delta A_{765} (A_{765} (\text{uzorka}) - A_{765} (\text{slijepa proba}))$$

x = vrijednost koncentracije ekvivalenta galne kiseline ($\mu\text{g}_{\text{GAE}} \text{mL}^{-1}$) (*GAE (engl. *galic acid equivalents*))

Ukoliko je korišten razrijeđeni uzorak, konačna koncentracija polifenola dobiva se množenjem s faktorom razjeđenja.

Rezultati udjela ukupnih polifenola izraženi su kao srednja vrijednost masene koncentracije ukupnih polifenola u odnosu na suhu tvar uzorka ($\mu\text{g}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), uz pripadajuću standardnu devijaciju.

3.2.4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je prema radu Brand-Williams i suradnika (godina).

Princip metode:

DPPH radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) posjeduje nespareni elektron te pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti antioksidansa, dolazi do sparivanja slobodnog elektorna DPPH radikala i primjene boje reakcijske otopine iz ljubičaste u žutu. Antioksidacijski kapacitet se iskazuje kao mjera smanjenja intenziteta boje otopine radikala u prisutnosti nekog antioksidansa i izražava kao ekvivalentna koncentracija standarda Trolox-a koja rezultira istim učinkom (Blois, 1958; Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995).

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH radikala u metanolu. U plastične kivete za spektrofotometar se otpipetira 1,95 mL otopine radikala i 50 μL uzorka te se promiješa na vorteksu. Reakcija se provodi tijekom 30 min, u tami i pri sobnoj temperaturi. Po isteku vremena reakcije, mjeri se intenzitet obojenja pri 515 nm, uz slijepu probu koja umjesto uzorka sadrži jednaki volumen otapala u kojem je pripremljen ekstrakt. Po potrebi se reakcija provodi s razrijeđenim uzorkom (ukoliko reakcijska otopina poprimi žutu boju). Reakcija je provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izračun rezultata:

Za izradu baždarne krivulje koristi se standard Trolox-a (vodeno-topiv sintetski analog vitamina E, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) koji se pripremi u sljedećim

koncentracijama 100, 200, 400, 600 i 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Provede se reakcija za svaku koncentracijsku točku prema gore opisanom postupku te se izmjeri vrijednost apsorbancije pri 515 nm. Konstruira se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Jednadžba baždarnog pravca reakciju s DPPH radikalom, za standard Trolox-a, glasi [4]:

$$y = 0,6 x \quad [4]$$

gdje je:

$$y = \Delta A_{515} (A_{515} (\text{slijepa proba}) - A_{515} (\text{uzorak}))$$

$$x = \text{vrijednost koncentracije ekvivalenata Trolox-a (mM}_{\text{Trolox}} \text{ mL}^{-1})$$

Ukoliko je korišten razrijeđeni uzorak, konačna koncentracija ekvivalenata Trolox-a dobiva se množenjem s faktorom razrijeđenja.

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom izraženi su kao srednja vrijednost molarne koncentracije ekvivalenata Trolox-a u odnosu na suhu tvar uzorka ($\text{mM}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), uz pripadajuću standardnu devijaciju.

3.2.4.3. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom*

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provedeno je prema radu Re i suradnika (1999).

Princip metode:

ABTS radikal-kation formira se kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. U prisutnosti antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog ABTS radikala, što ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije, a prati se smanjenjem apsorbancije otopine radikala pri 734 nm. Antioksidacijski kapacitet se iskazuje kao mjera smanjenja intenziteta boje otopine radikala u prisutnosti nekog antioksidansa i izražava kao ekvivalentna koncentracija standarda Trolox-a koja rezultira istim učinkom

Postupak rada:

Otopinu ABTS^+ radikala priprema se oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM (doda se 88 μL 140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata u odmjernu tikvicu od 5 mL te se nadopuni do oznake 7 mM otopinom ABTS reagensa). Reakcija oksidacije provodi se tijekom najmanje 12 h, u tami i pri sobnoj temperaturi. Prije same analize, tako pripremljena otopina se razrjeđuje 96 %-tnim etanolom do konačne koncentracije ABTS^+ radikala od 1 % (v/v), odnosno da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm. Reakcija se provodi tijekom 6 min, u tami i pri sobnoj temperaturi. Po isteku vremena reakcije, mjeri se intenzitet obojenja pri

734 nm, uz slijepu probu koja umjesto uzorka sadrži jednaki volumen otapala u kojem je pripremljen ekstrakt. Po potrebi se reakcija provodi s razrijeđenim uzorkom (ukoliko reakcijska otopina poprimi žutu boju). Reakcija je provedena u paraleli za svaki uzorak.

Izračun rezultata:

Za izradu baždarne krivulje koristi se standard Trolox-a (vodeno-topiv sintetski analog vitamina E, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) koji se pripremi u sljedećim koncentracijama 100, 200, 400, 600 i 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Provede se reakcija za svaku koncentracijsku točku prema gore opisanom postupku te se izmjeri vrijednost apsorbancije pri 734 nm. Konstruira se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Jednadžba baždarnog pravca reakciju s ABTS radikalom, za standard Trolox-a, glasi [5]:

$$y = 0,3115 x \quad [5]$$

gdje je:

$$y = \Delta A_{734} (A_{734} (\text{slijepa proba}) - A_{734} (\text{uzorak}))$$

$$x = \text{vrijednost koncentracije ekvivalenata Trolox-a (mM}_{\text{Trolox}} \text{ mL}^{-1})$$

Ukoliko je korišten razrijeđeni uzorak, konačna koncentracija ekvivalenata Trolox-a dobiva se množenjem s faktorom razjeđenja.

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom izraženi su kao srednja vrijednost molarne koncentracije ekvivalenata Trolox-a u odnosu na suhu tvar uzorka ($\text{mM}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$), uz pripadajuću standardnu devijaciju.

3.2.4.4. Određivanje udjela vezanih fenolnih spojeva

Vezani fenolni spojevi izdvajaju se iz alkoholno-netopljivog ostatka, tj. prethodno ekstrahiranog materijala (v. poglavlje 3.2.3.1.). U tu svrhu, alkoholno-netopljivi ostatak je nakon sušenja izmjenom otapala dodatno usitnjen na kugličnom mlinu (60 s, frekvencija 30 s^{-1}). Provedeni postupak ekstrakcije vezanih fenolnih spojeva predstavlja modificirani protokol prema radu Arruda i suradnika (2017.).

Postupak:

U plastičnu Falcon epruvetu izvaže se približno 50 mg uzorka te se doda 1,25 mL otopine koja sadržava 20 mM EDTA i 2 % (w/v) askorbinske kiseline. Zatim se doda redom 375 μL 80 % EtOH, 625 μL 8 M NaOH i 250 μL internog standarda koncentracije (1 mg mL^{-1}). Alkalna hidroloza tako tako pripremljenog uzorka provodi se pri sobnoj temperaturi, tijekom 2 h te uz kontinuirano miješanje na magnetskoj mješalici. Po isteku vremena, dodaje se 1,5 mL 4 M HCl i 1 mL 5 M otopine NaCl. Uzorci se zatim centrifugiraju pri 9000 o min^{-1} tijekom 5 min i sobnoj temperaturi. Supernatant se odvoji u čistu epruvetu.

Daljnja priprema uzorka provedena je na 2 načina: (1) ekstrakcijom tekuće-tekuće smjesom otapala dietil eter-etil acetat 1:1 (v/v) i (2) ekstrakcijom na SPE (engl. solid phase extraction) preparativnim kolonicama.

1) Ekstrakcija tekuće-tekuće smjesom otapala dietil eter-etil acetat

Izuzme se alikvot od 2 mL supernatanta te se pomiješa s jednakim volumenom smjese otapala dietil eter-etil acetat (DE-EA) u staklenoj epruveti s čepom na navoj te se intenzivno vorteksira tijekom 30 sekundi. Faze se razdvoje kratkim cantrifugiranjem (4000 o min^{-1} , 2 min, 4 °C), a zatim se izuzme 1 mL gornje faze (DE-EA) i prenese u čistu epruvetu. Alikvot se upari do suhoga u struji dušika i uz zagrijavanje pri 40 °C. Suhi talog se resuspendira u 1 mL 80 %-tnog etanola. U tako pripremljenom uzorku određeni su pojedinačni fenolni spojevi.

2) ekstrakcija na SPE preparativnim kolonicama

SPE kolonice se pripreme na sljedeći način: doda se 1 mL metanola na vrh kolonice te se isti propušta kap po kap. Zatim se doda 2 mL demineralizirane vode koja se također eluira kap po kap te se zaustavi tik iznad razine punila. Na tako pripremljene kolonice, nanosi se alikvot od 1 mL supernatanta te se eluira kap po kap, a zatim se ispiri s 1 mL demineralizirane vode. Vezani polifenoli za punilo kolonice eluiraju se dodatkom 1 mL metanola te se eluat skuplja u čistu epruvetu (2 mL). U tako pripremljenom uzorku određeni su pojedinačni fenolni spojevi.

Osim uzorka, na jednak način je pripremljena i smjesa standarada (t-ferulinska i p-kumarinska kiselina). Alkalna hidroliza uzoraka u svrhu izdvajanja vezanih fenolnih spojeva, provedena je u triplikatu.

3.2.4.5. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Pojedinačni slobodni i vezani polifenoli spojevi određeni su pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) prema novo razvijenoj metodi. Korištena je stacionarna faza Kinetex 2,6 μm Biphenyl 100 Å (4,6 x 150 mm) s odgovarajućom pretkolonom s istom stacionarnom fazom. Mobilnu fazu činio je dvokomponentni sustav: A- 0,1 %-tna otopina mravlje kiseline u vodi i B-0,1 %-tna otopina mravlje kiseline u acetonitrilu. Elucija je provedena gradijentno prema sljedećem režimu: 0. min - 10 % B, 2. min - 10 % B 17. min - 45 % B, 20. min - 70 % B, 23. min - 70 % B, 25. min - 10 % B, 5 min ekvibracija, uz protok mobilne faze od $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Temperatura kolone iznosila je 35 °C, a volumen injektiranja 5 μL . Detekcija je provedena DAD detektorom (engl. *diode array detector*) pri valnim duljinama 260, 278, 320, 350 i 370 nm, dok su apsorpcijski spektri snimljeni u rasponu 190-450 nm.

Prije analize, svi uzorci su profiltrirani kroz mikrofiltere (Chromafil Xtra RC-20/13, 0.20 um, 13 mm).

Identifikacija spojeva na kromatogramima provedena je usporedbom retencijskih vremena i karakterističnih apsorpcijskih spektara s dostupnim analitičkim standardima, dok je kvantifikacija provedena sa (vezani fenolni spojevi) ili bez (slobodni fenolni spojevi) internog standarda pomoću odgovarajućih baždarnih pravaca za pojedine identificirane spojeve (Tablica 1.).

Tablica 1. Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedinačne fenolne spojeve određivane u uzorcima talijanskog ljulja i slame heljde

Naziv spoja	koncentracijski raspon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	valna duljina detekcije (nm)	Jednadžba baždarnog pravca	
			bez internog standarda	s internim standardom
rutin	1-100	350	$y=15,291x+6,1168$ $R^2=0,9999$	-
kvercetin	1-100	370	$y=40,781x-17,467$ $R^2=0,9999$	-
<i>t</i> -ferulinska kiselina	0,2-2,0*	320	-	$y=1,0065x+0,0041$ $R^2=0,9947$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,2-2,0*	320	-	$y=1,1626x+0,0179$ $R^2=0,9993$

*relativna koncentracija s obzirom na koncentraciju internog standarda – kafeinska kiselina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.5. Karakterizacija ugljikohidratne frakcije

3.2.5.1. Određivanje udjela vlakana

Topljiva i netopljiva vlakna određena su primjenom specijaliziranog seta (K-INTDF, Megazyme), prema protokolu proizvođača. Protokol je sukladan s AOAC 2011.25 metodom (McCleary, 2012). Izvorni uzorci talijanskog ljulja i slame heljde prethodno su dodatno usitnjeni u kugličnom mlinu.

Protokol se sastoji od nekoliko faza:

- 1) enzimski digestija α -amilazom, amiloglukozidazom i proteazom, nakon čega se izdvajaju netopljiva vlakna velike molekulske mase
- 2) precipitacija topljivih vlakana u digestu dodatkom etanola te izdvajanje frakcije topljivih vlakana velike molekulske mase
- 3) šušenje izdvojenih frakcija netopljivih i topljivih vlakana do konstantne mase (gravimetrijsko određivanje)
- 4) određivanje udjela pepela i proteina u frakcijama netopljivih i topljivih vlakana u svrhu korekcije rezultata udjela netopljivih i topljivih vlakana

Udio pepela u frakcijama određen je prema AOAC 942.05 metodi (Padmore, 1990a) , suhom mineralizacijom uzorka pri 575 °C, dok je udio proteina određen prema AOAC 976.05 metodi (Padmore, 1990b), metodom po Kjeldahlu (poluautomatski).

Određivanje udjela vlakana provedeno je tetraplikatu, doksu korekcijske metode (pepeo, proteini) provedene u duplikatu. Rezultati udjela vlakana prikazani su kao maseni udjeli (%) u suhoj tvari izvornog uzorka.

3.2.5.2. *Određivanje monomernog sastava polisaharida stanične stijenke*

Određivanje monomernog sastava polisaharida stanične stijenke provedeno je na uzorcima alkoholno-netopljivih ostataka talijanskog ljulja i slame heljde, prema postupku opisanom u radu Vojvodić Cebin i suradnika (2021). Postupak se sastoji od nekoliko koraka, kao slijedi:

- 1) kiselinska hidroliza
- 2) PMP derivatizacija
- 3) HPLC analiza

Postupak rada:

1) Kiselinska hidroliza uzorka

Odvaže se približno 25 mg uzorka u triplikatu u staklene epruvete s čepovima na navoj, pazeći da uzorak ne ostaje na stijenakama. U uzorke se dodaje 250 µL sumporne kiseline (72 % w/w) te se uzorak ručno miješa pomoću staklenog štapića tijekom 30 min i pri sobnoj temperaturi. Zatim se dodaje 2,25 mL demineralizirane vode, 0,5 mL otopine internog standarda (riboza, 2,4 mg mL⁻¹), uzorak se vorteksira te se izvadi stakleni štapić. Začepljene epruvete se stave u termoblok zagrijan na 100 °C te se hidroliza provodi 2 h. Po isteku vremena, epruvete se ohlade u kupelji s hladnom vodom te centrifugiraju (3500 o min⁻¹, 5 min, sobna temperatura). Izuzme se 1 mL supernatanta u čistu Falcon epruvetu od 15 mL te se postupno dodaje čvrsti kalcijev karbonat (CaCO₃, u količini određenoj stehiometrijom reakcije, približno 0,13 g) u svrhu neutralizacije. Nakon prestanka pjenjenja, neutralizirani uzorci se centrifugiraju (9500 o min⁻¹, 10 min, sobna temperatura), izdvoji se supernatant (300 – 400 µL) te se provjeri pH pomoću indikatorskih trakica (pH 6,5 – 7,0).

2) Derivatizacija s PMP reagensom

Otpipetira se 50 µL neutralnog hidrolozata u Eppendorf epruvete 2 mL te se doda 50 µL 0,6 M otopine NaOH, a zatim i 100 µL metanolne otopine PMP reagensa (5 M). Začepljene epruvete se urone u kupelj zagrijanu pri 70 °C te se derivatizacija odvija tijekom 60 min, uz povremeno miješanje na vorteksu. Po završetku derivatizacije, epruvete se kratko ohlade u kupelji s hladnom vodom, a zatim se uzorak neutralizira dodatkom 110 µL 0,3 M otopine HCl. Doda se još 690 µL

demineralizirane vode te se provjeri pH pomoću indikatorskih trakica (pH 4-6). Suvišak PMP reagensa uklanja se dvostrukom ekstrakcijom tekuće-tekuće s kloroformom (0,5 mL). Kontakt faza ostvaruje se intenzivnim vorteksiranjem, a separacija kratkim centrifugiranjem na mini centrifugi. Izuzima se 750 µL gornje vodene faze za HPLC analizu.

3) HPLC-DAD analiza PMP derivata monosaharida

Pojedinačni slobodni i vezani polifenoli spojevi određeni su pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Korištena je kromatografska kolona Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm). Mobilnu fazu činio je dvokomponentni sustav: A- 100 mM Na-fosfatni pufer, pH 8,0 i B- 100 % acetonitril. Elucija je provedena gradijentno prema sljedećem režimu: 0. min - 12 % B, 35. min - 10 % B, 40. min - 17 % B, 41. min - 20 % B, 50. min - 20 % B, 51. min - 12 % B, 65. min - 12% B, uz protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹. Temperatura kolone iznosila je 25 °C, a volumen injektiranja 10 µL. Detekcija je provedena DAD detektorom (engl. *diode array detector*) pri valnoj duljini 245 nm. Prije analize, svi uzorci su profiltrirani kroz mikrofiltre (Chromafil Xtra RC-20/13, 0.20 µm, 13 mm). Identifikacija spojeva na kromatogramima provedena je usporedbom retencijskih vremena s dostupnim analitičkim standardima, dok je kvantifikacija provedena s internim standardom (riboza, 400 µg mL⁻¹ u uzorku) pomoću odgovarajućih baždarnih pravaca za pojedine monomerne šećere (Tablica 2.). U svrhu pripreme odgovarajućih baždarnih pravaca, pripremljena je smjesa standarada monomernih šećera te je podvrgnuta kiselinskoj hidrolizi (100 °C, 2 h, 1 M H₂SO₄), a nakon toga neutralizaciji i PMP derivatizaciji kako je opisano.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedinačne fenolne spojeve određivane u uzorcima talijanskog ljlja i slame heljde

Naziv spoja	Jednadžba baždarnog pravca	Koncentracijski raspon*
Manoza	$y=0,8434x-0,0006$, $R^2=0,9984$	0,1 - 1
Ramnoza	$y=0,8904x-0,0072$, $R^2=0,9991$	0,1 - 1
Glukuronska kiselina	$y=0,724x-0,00007$, $R^2=0,9991$	0,1 - 1
Galakturonska kiselina	$y=0,7463x-0,0006$, $R^2=0,9991$	0,1 - 1
Glukoza	$y=0,7948x+0,0041$, $R^2=0,9987$	0,1 - 1
Ksiloza	$y=1,024x-0,0076$, $R^2=0,9987$	0,1 - 1
Galaktoza	$y=0,996x-0,0178$, $R^2=0,9980$	0,1 - 1
Arabinoza	$y=1,1842x-0,0155$, $R^2=0,9985$	0,1 - 1
Fukoza	$y=0,9309x-0,0151$, $R^2=0,9986$	0,1 - 1

*u odnosu na interni standard riboze u koncentraciji 400 µg mL⁻¹

3.2.6. Obrada podataka

Srednje vrijednosti i standardne devijacije za sve prikupljene podatke izračunate su pomoću programa Microsoft Excel (IBM; SAD). Za obradu kromatograma i uvid u apsorpcijske spektre korišten je OpenLAB Chemstation (Agilent Technologies, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

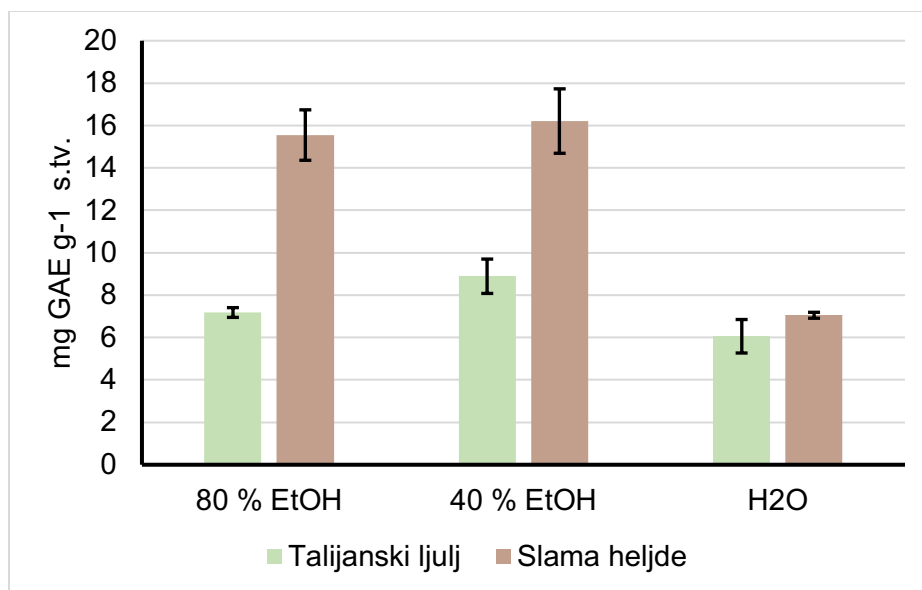
U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz talijanskog ljulja (*Lolium multiflorum* Lam.) i slame heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench.) primjenom konvencionalne ekstrakcije uz zagrijavanje te potpomognute mikrovalovima. Dobiveni ekstrakti karakterizirani su s obzirom na udio ukupnih polifenola (reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom), antioksidacijski kapacitet (ABTS i DPPH) te udio pojedinačnih polifenolnih spojeva (HPLC-DAD). Također su određeni i vezani fenolni spojevi nakon alkalne hidrolize (HPLC-DAD). U radu je također provedena i karakterizacija ugljikohidratne frakcije uzoraka određivanjem udjela topljivih i netopljivih vlakana pomoću specijaliziranog seta za određivanje vlakana (K-INTDF) te monomernog sastava polisaharida stanične stijenke nakon potpune kiselinske hidrolize i HPLC-DAD analize s prekolonskom PMP-derivatizacijom.

Ovim istraživanjem dobiven je bolji uvid u potencijal talijanskog ljulja i slame heljde kao lignoceluloznih sirovina koje još nisu dovoljno iskorištene, pogotovo kao potencijalnih izvora bioaktivnih spojeva.

4.1. POLIFENOLNA FRAKCIJA TALIJANSKOG LJULJA I SLAME HELJDE

4.1.1 Karakterizacija spektrofotometrijskim metodama

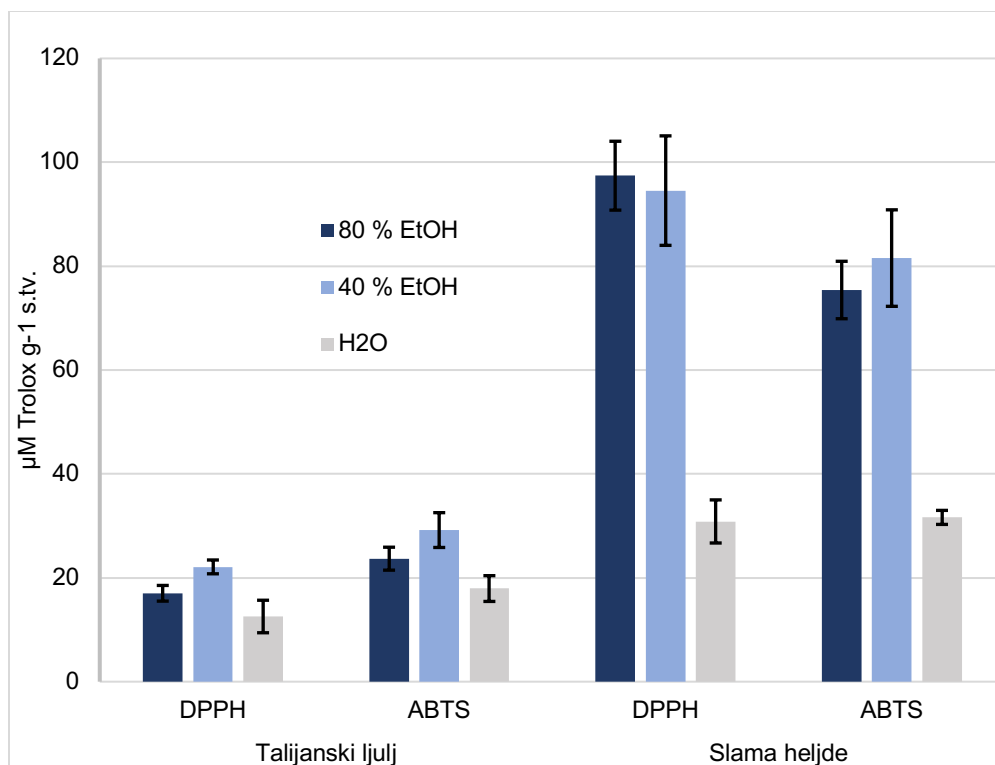
Ekstrakti uzoraka pripremljeni su konvencionalnom ekstrakcijom primjenom različitih otapala, tj. demineralizirane vode i hidroalkoholnih otopina u dvije koncentracije etanola: 40 i 80 % (v/v). Za usporedbu učinkovitosti metode, uzorci su dodatno ekstrahirani primjenom mikrovalova prema definiranoj metodi, a pritom je kao otapalo korišten 80 %-tni etanol. Ekstrakcijska učinkovitost konvencionalne i mikrovalne ekstrakcije uspoređena je na temelju izmjerenih udjela ukupnih polifenola (slika 10), antioksidacijskog kapaciteta (slika 11) i pojedinačnih polifenolnih spojeva (Tablica 3.).



Slika 10. Udjeli ukupnih polifenola u ekstraktima ljulja i slame heljde pripremljenima konvencionalnom ekstrakcijom (mg GAE g⁻¹ suhe tvari uzorka)

Iz prikazanih rezultata (slika 10), vidljivo je da ekstrakt slame heljde sadrži značajno, gotovo dvostruko, veći udio polifenolnih spojeva od ekstrakta talijanskog ljulja, za konvencionalnu ekstrakciju, uz iznimku vodenog ekstrakta, koji je rezultirao približno jednakim udjelima ukupnih polifenola za oba uzorka. S obzirom na otapalo, neovisno o uzorku, primjena vode kao ekstrakcijskog otapala rezultirala je najnižim udjelima ukupnih polifenola (6,08 mg GAE g⁻¹ s.tv. za talijanski ljulj i 7,05 mg GAE g⁻¹ s.tv. za slamu heljde), odnosno, viši prinosi ukupnih polifenola određeni su primjenom vodeno-alkoholnih otopina, a pritom nije određena puno veća razlika između 40 %-tne i 80 %-tne otopine. Ipak, nešto viši, a ujedno i najviši prinosi ukupnih polifenola određeni su u ekstraktima s 40 %-tnim etanolom (8,89 mg GAE g⁻¹ s.tv. za talijanski ljulj i 16,21 mg GAE g⁻¹ s.tv. za slamu heljde). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ekstrakciji polifenola slame heljde pogoduje smanjenje polarosti otapala, a pritom udio etanola od 40 % (v/v) je bio dovoljan za uspješnu ekstrakciju, odnosno, povećanje udjela etanola nije značajno povećalo prinos ukupnih polifenola. S druge strane, može se zaključiti da talijanski ljulj sadrži općenito manje polifenola u odnosu na slamu heljde te su oni više hidrofilnog karaktera. U istraživanju Kuppusamy i sur. (2018), udio ukupnih polifenola u 70 %-tnom EtOH ekstraktu iznosio je 19,54 ± 0,36 mg GAE g⁻¹ uzorka, što je više od udjela određenog u ovome radu i može se pripisati inicijalnim razlikama u samim uzorcima.

Ekstraktima pripremljenima konvencionalnom ekstrakcijom određen je i antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodom (slika 11).

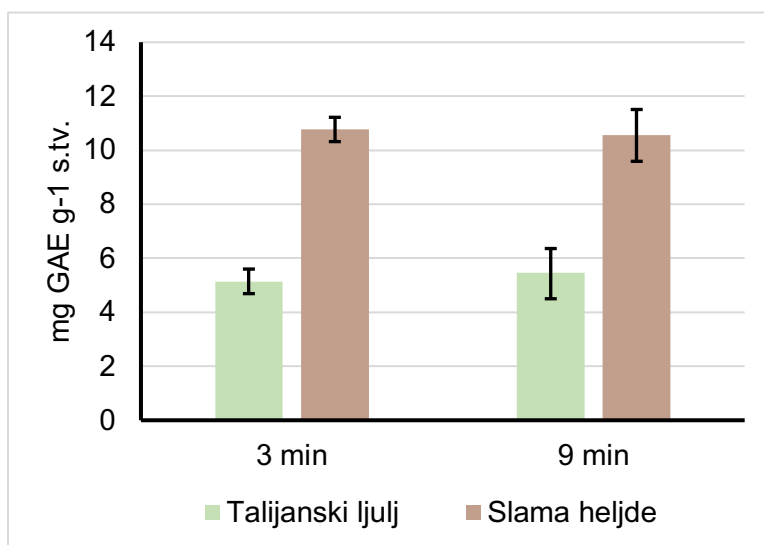


Slika 11. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama u ekstraktima talijanskog ljulja i slame heljde pripremljenima konvencionalnom ekstrakcijom ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ suhe tvori uzorka)

Iz dobivenih rezultata, vidljivo je kako obje metode pokazuju jednak trend s obzirom na sličan princip djelovanja. Iz prikazanog, ekstrakti slame heljde pokazali su značajno veći antioksidacijski kapacitet od ekstrakata talijanskog ljulja, što je također u pozitivnoj korelaciji u udjelom ukupnih polifenola u ekstraktima. Najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta za slamu heljde određena je u vodeno-alkoholnim ekstraktima - DPPH metodom u 80 % etoh ekstraktu ($97,42 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.) i ABTS metodom u 40 % etoh ekstraktu ($81,56 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.). U vodenom ekstraktu slame heljde, određen je višestruko niži antoksidacijski kapacitet, od približno $31 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv. Najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta talijanskog ljulja određena je u 40 % etoh ekstraktu (DPPH $22,10 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.; ABTS $29,19 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.), dok najniža u vodenom ekstraktu (DPPH $12,55 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.; ABTS $17,93 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.).

U svrhu određivanja mogućnosti povećanja ekstrakcijskih prinosa polifenola iz uzoraka talijanskog ljulja i slame heljde, istražena je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, a kao otapalo je korišten 80 %-tni etanol. Pritom je temperatura ekstrakcije iznosila $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kao i kod

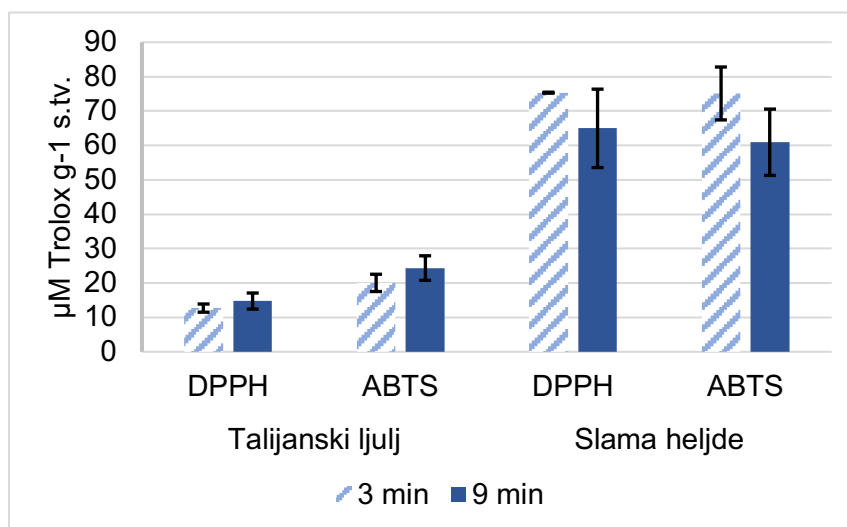
konvencionalne ekstrakcije, a varirano je trajanje ekstrakcije - 3 i 9 minuta. Rezultati udjela ukupnih polifenola prikazani su na slici 12.



Slika 12. Udjeli polifenola u ekstraktima talijanskog ljulja i slame heljde pripremljenima ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (mg GAE g⁻¹ suhe tvari uzorka)

Iz dobivnih rezultata je vidljivo da, kao i u slučaju konvencionalne ekstrakcije, ekstrakt slame heljde je sadržavao više ukupnih polifenola, a produljenje trajanja ekstrakcije nije utjecalo na prinos ukupnih polifenola (približno 11 mg GAE g⁻¹ s.tv.). U odnosu na konvencionalnu ekstrakciju s istim otapalom, MAE ekstrakcijom je ostvarno približno 70 % ekstrakcijskog prinosa, odnosno, nije postignuta uspješnija ekstrakcija pri definiranim uvjetima. Za uzorak talijanskog ljulja, MAE ekstrakcija rezultirala je također nižim udjelom ukupnih polifenola u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju istim otapalom (približno 5 mg GAE g⁻¹ s.tv., odnosno približno 70 % udjela određenog u ekstraktu pripremljenom konvencionalnom ekstrakcijom). Kao i u slučaju slame heljde, produljenje MAE nije rezultiralo povećanjem udjela ukupnih polifenola u uzorku talijanskog ljulja. Božac (2018) je usporedio primjenu ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i konvencionalnu ekstrakciju metodom po Soxhletu na uzorku komine masline. Primjenom MAE postignuto je ~20% veće iskorištenje procesa ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu metodu, pri značajno kraćem trajanju ekstrakcije (za ~95%) i uporabi manjeg volumena otapala. Primjenom MAE dobivene su i veće koncentracije pojedinih bioaktivnih spojeva te ekstrakcije spoja koji konvencionalnim načinom nije detektiran. Mirković (2016) je u svom radu na korjenu i listu maslačka usporedila MAE s ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE). Primjenom MAE dobiveni su veći prinosi ukupnih fenolnih spojeva iz korijena i lista maslačka u usporedbi s UAE.

Ekstraktima pripremljenima ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima određen je i antioksidacijski kapacitet ABTS i DPPH metodom (slika 13).



Slika 13. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS i DPPH metodama u ekstraktima talijanskog ljulja i slame heljde pripremljenima ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ suhe tvari uzorka)

Kao i za konvencionalnu ekstrakciju, obje metode pokazale su jednak trend te je slama heljde pokazala značajno veći antioksidacijski kapacitet, proporcionalno rezultatima udjela ukupnih polifenola u MAE ekstraktima. Za oba uzorka primijećen je utjecaj produljenja ekstrakcije, tj. kod talijanskog ljulja je primijećeno blago povećanje antioksidacijskog kapaciteta nakon 9 min mikrovalne ekstrakcije, dok je za slamu heljde primijećeno smanjenje antioksidacijskog kapaciteta nakon 9 min ekstrakcije. Sukladno tome, najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta za talijanski ljulj određene su nakon 9 min MAE ekstrakcije (DPPH $14,75 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv. i ABTS $24,34 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.), tj. 3 min MAE ekstrakcije u slučaju slame heljde (DPPH $75,33 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv. i ABTS $75,11 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ s.tv.). Smanjenje antioksidacijskog kapaciteta produljenjem ekstrakcije potencijalno se može objasniti modifikacijom spojeva nositelja antioksidacijskih svojstava, najčešće polifenola, u spojeve koji iskazuju manji antioksidacijski učinak, ili pak njihovom degradacijom, ovisno o svojstvima biljnog matriksa, uvjetima ekstrakcije i svojstvima samih polifenolnih spojeva. Biesaga i suradnici (2011) odredili su degradaciju odabranih flavonoida ovisno o trajanju i primijenjenoj snazi tijekom mikrovalne ekstrakcije.

Iako MAE nudi mogućnost brze i učinkovite ekstrakcije sekundarnih biljnih metabolita (među njima i polifenola), tj. povećanje ekstrakcijskih prinosa u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju, u ovome radu to nije potvrđeno. Konvencionalni način ekstrakcije iziskuje veći utrošak vremena, ali

financijski je prihvatljiviji i lakše ga je optimizirati s obzirom na različita otapala. Mogući razlog manjeg prinosa MAE je i mogućnost potrebe optimizacije metode s obzirom na brojne parametre koji mogu utjecati na uspješnost ovog načina ekstrakcije, za korišteni uzorak i otapalo, što u ovom radu nije napravljeno.

4.1.2. Udio pojedinačnih slobodnih polifenola

Pojedinačni slobodni polifenoli određeni su u ekstraktima pripremljenima konvencionalnom i mikrovalnom ekstrakcijom, kromatografijom obrnutih faza. S obzirom na dostupne standarde, uspješno su identificirana 2 polifenolna spoja – rutin i kvercetin, ujedno dominantni pikovi na kromatogramima (Prilozi 1 i 2). Udjeli slobodnih polifenola u različito pripremljenim ekstraktima prikazani su u Tablici 3.

Dominantan spoj u ekstraktima talijanskog ljulja bio je rutin, a njegov najveći udio određen je u 80 %-tnom etanolnom ekstraktu ($376 \mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Udio kvercetina u istom ekstraktu bio je približno 10 puta manji. Smanjenjem koncentracije etanola u otapalu (40 %), također je smanjen i prinos rutina, dok kvercetin nije ekstrahiran. U vodenom ekstraktu određen je najniži udio rutina, dok kvercetin nije određen. Mikrovalnom ekstrakcijom postignuta je približno jednaka ekstrakcijska učinkovitost kao i konvencionalnom ekstrakcijom, a pritom produljenje ekstrakcije nije utjecalo na prinose kvercetina i rutina. U slami heljde je kao dominantan spoj određen također rutin, a njegov najveći udio određen je nakon konvencionalne ekstrakcije 80 %-tnim etanolom ($6434 \mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Osim rutina, u značajnoj koncentraciji je određen i kvercetin, najvišeg udjela također u 80 % etanolnom ekstraktu ($900 \mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$). Smanjenjem koncentracije etanola u otapalu do 40 %, također se smanjio udio ekstrahiranog rutina za približno 25 %, dok kvercetina za čak približno 70 %. U vodenom ekstraktu slame heljde udjeli rutina i kvercetina bili su više od 95 % manji u odnosu na ekstrakciju 80 %-tnim etanolom. U MAE ekstraktima slame heljde, u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju istim otapalom, određeno je približno 20-25 % manje rutina i približno 55 % manje kvercetina. Utjecaj trajanja ekstrakcije donekle se očitovao u blagom smanjenju udjela rutina i povećanju udjela kvercetina. Na kromatogramima MAE ekstrakata (Prilog 3) osim rutina i kvercetina, mogla su se primijetiti još 2 djelomično koeluirana pika od kojih je jedan identificiran kao kvercetin-3-glukozid. Postoji mogućnost da je primjenom mikrovalova došlo do djelomične razgradnje rutina, što potencijalno može objasniti smanjenje udjela rutina i povećanje udjela kvercetina za 9 min MAE ekstrakciju. S obzirom na relativno niske prinose kvercetina, osim njegove djelomične degradacije, rezultati se mogu potencijalno dodatno objasniti različitim dinamikom njegove ekstrakcije, tj. možda je smanjeno vrijeme kontakta između otapala i uzorka,

u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju, rezultiralo manjim prinom ovog spoja u ekstraktu. Rezultati su sukladni rezultatima udjela ukupnih polifenola.

Tablica. 3. Udio pojedinačnih slobodnih polifenolnih spojeva u različito pripremljenim ekstraktima talijanskog ljulja i slame heljde

Tip ekstrakcije	Uzorak	Varijabilni parametri ekstrakcije	Polifenolni spoj	
			Kvercetin $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$	Rutin $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$
Konvencionalna ekstrakcija	Talijanski ljulj	80 % EtOH	32,35 ± 3,39	375,63 ± 35,39
		40 % EtOH	n.d.	309,43 ± 8,64
		voda	n.d.	63,14 ± 1,00
	Slama heljde	80 % EtOH	900,39 ± 46,38	6434,29 ± 250,39
		40 % EtOH	265,63 ± 53,92	4729,60 ± 318,23
		voda	36,27 ± 2,12	265,13 ± 15,49
MAE	Talijanski ljulj	3 min	32,98 ± 3,75	312,47 ± 4,06
		9 min	38,06 ± 2,41	317,45 ± 30,07
	Slama heljde	3 min	385,70 ± 3,39	5257,04 ± 360,16
		9 min	419,98 ± 5,82	4939,99 ± 317,37

S obzirom da su u istraživanim biljnim vrstama dominantni slobodni polifenoli flavonoidi, među kojima kvercetin i njegovi glikozidi, preferabilna je primjena otapala većeg udjela etanola (80 %), pogotovo za uspješnu ekstrakciju kvercetina. Rutin (kvercetin rutinozid) je više hidrofilnog karaktera u odnosu na kvercetin aglikon zbog prisutnosti više hidroksilnih skupina koje se nalaze na molekuli šećera te se lakše ekstrahirao. U usporedbi sa spektrofotometrijskim metodama (slike 10-13), gdje je 40 % etanolni ekstrakt pokazao nešto veći udio ukupnih polifenola i veći antioksidacijski kapacitet, HPLC analiza je pokazala ipak veći udio slobodnih polifenola u 80 % etanolnom ekstraktu. Upravo zato je ovo otapalo korišteno u mikrovalnim ekstrakcijama. Drugi, neidentificirani spojevi u ekstraktima su mogli interferirati sa spektrofotometrijskim metodama karakterizacije te smanjiti njihovu preciznost.

Prema dostupnoj literaturi, nema puno istraživanja u kojima su određivani polifenolni spojevi talijanskog ljulja. U istraživanju Kuppusamy i suradnika (2018), u 70 % etanolnom ekstraktu talijanskog ljulja određene su fenolne kiseline: *p*-kumarinska ($219 \mu\text{g g}^{-1}$), *t*-ferulinska ($207 \mu\text{g g}^{-1}$), klorogenska ($200 \mu\text{g g}^{-1}$), dihidroksibenzojeva ($188 \mu\text{g g}^{-1}$) i kafeinska ($127 \mu\text{g g}^{-1}$), dok od flavonoida: katehin ($131 \mu\text{g g}^{-1}$), miricetin ($198 \mu\text{g g}^{-1}$) rutin ($193 \mu\text{g g}^{-1}$), luteolin ($181 \mu\text{g g}^{-1}$),

viteksin ($172 \mu\text{g g}^{-1}$), kemferol ($161 \mu\text{g g}^{-1}$) i narcisozid ($123 \mu\text{g g}^{-1}$). U istraživanju Choi i suradnika (2016), u različitim frakcijama iz izvorno metanolnog ekstrakta siliranog talijanskog ljulja, također su određeni: kafeinska, *t*-ferulinska, *p*-kumarinska kiselina te katehin, miricetin, kvercetin i kemferol. U ovome radu, uspješno su identificirani samo rutin i kvercetin u ekstraktima talijanskog ljulja. Ostali pikovi, s obzirom na karakteristične apsorpcijske spektre u području 190-450 nm, ukazuju na prisutnost i drugih flavonoida i njihovih konjugata, ali vjerojatno u nižim koncentracijama nego rutin (s obzirom na niži intenzitet pikova). Varijabilnost sastava biljnih materijala, pogotovo s obzirom na udio sekundarnih metabolita, kakvi su i polifenoli, može biti posljedica brojnih faktora koji utječu na njihovu sintezu (stanište, klimatski uvjeti, izloženost biotičkom stresu, stadij rasta i dr.), a uvelike i o načinima pripreme biljnog materijala, pri čemu sušenje može značajno degradirati njihov udio.

Slama heljde također je slabo istražena u smislu polifenolnih spojeva te podaci za izravnu usporedbu s ovim istraživanjem nisu dostupni. Uglavnom su mogućnosti iskorištavanja nusproizvoda heljde usmjerena na posije koje sadrže značajne udjele flavonoida rutina, viteksina, orientina, izoorientina, izoviteksina (Kalinova i sur., 2019).

4.1.3. Udio vezanih polifenolnih spojeva

Polifenolni spojevi u biljkama nalaze se u slobodnom i/ili vezanom obliku. Vezani polifenolni spojevi, najčešće fenolne kiseline, poput hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina, nalaze se kovalentno vezani za stanične strukture poput polisaharida stanične stijenke, lignina ili proteina, esterskim ili eterskim vezama (Acosta-Estrada i sur., 2014). Zbog toga, vezani polifenolni spojevi moraju se prethodno osloboditi, tj. mora se narušiti kemijska veza s nekom strukturom, najčešće kemijskim ili enzimskim postupcima, kako bi se mogli ekstrahirati u određenom otapalu. U ovome radu provedena je alkalna hidroliza u svrhu izdvajanja vezanih polifenolnih spojeva iz uoraka talijanskog ljulja i slame heljde. Dodatak askorbinske kiseline i EDTA u otopinu lužine sprječava degradaciju deesterificiranih spojeva (Acosta-Estrada i sur., 2014), a metoda je varirana u koraku pročišćavanja izdvojenih spojeva i to: (i) primjenom ekstrakcije tekuće-tekuće sa smjesom otapala dietil eter - etil acetat (DE-EA) i (ii) primjenom ekstrakcije na čvrstom nosaču (SPE-C18). Izdvojeni spojevi analizirani su HPLC-DAD metodom (ista metoda kao i za određivanje slobodnih polifenolnih spojeva). Rezultati udjela vezanih polifenolnih spojeva prikazani su u Tablici 4.

Nakon alkalne hidrolize identificirane su dvije fenolne kiseline - *p*-kumarinska i *t*-ferulinska kiselina u oba uzorka. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u oba uzorka zastupljenija *t*-ferulinska kiselina te njezin udio u slami heljde iznosi približno $265 \mu\text{g gs.tv.}^{-1}$, dok u talijanskom ljulju približno $2300 \mu\text{g gs.tv.}^{-1}$, gotovo 10 puta više nego u slami heljde.

Tablica 4. Udjeli vezanih polifenolnih spojeva u talijanskom ljuju i slami heljde

Uzorak	Metoda pročišćavanja spojeva	Vezani polifenoli ($\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$)	
		<i>p</i> -kumarinska kiselina	<i>t</i> -ferulinska kiselina
Slama heljde	DE-EA	140,60 \pm 24,46	265,23 \pm 39,09
	SPE-C18	148,81 \pm 20,41	264,23 \pm 38,45
Talijanski ljuj	DE-EA	1004,43 \pm 69,47	2295,41 \pm 91,33
	SPE-C18	1017,46 \pm 85,88	2315,23 \pm 85,80

Udio *p*-kumarinske kiseline u slami heljde iznosi približno 140 $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$, a u talijanskm ljuju približno 1010 $\mu\text{g g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$, također gotovo 10 puta više. S obzirom na primijenjenu metodu pročišćavanja alkalnih hidrolizata prije HPLC analize (DE-EA ili SPE-C18), vidljivo je da su obje metode rezultirale jednakim prinosima. Prednost se može dati pročišćavanju na SPE-C18 kolonicama zbog jednostavnog korištenja i skraćivanja ukupnog trajanja postupka izdvajanja vezanih polifenola, dok se kao nedostatak može navesti cijena kolonica. S druge strane, pročišćavanje primjenom DE-EA sustava otapala nudi jednako učinkovitu alternativu, ali vremenski nešto zahtjevniju, uz korištenje lako hlapivih organskih otapala koja nose toksikološki rizik. Prisustvo *p*-kumarinske i *t*-ferulinske kiseline očekuje se u staničnim stijenkama različitih rodova i vrsta iz porodice trava (Poaceae), gdje imaju fiziološku ulogu u formiranju staničnih stijenki i povezivanju drugih polimernih elemenata samih staničnih stijenki (referenca Vogel, 2008). Nema puno dostupnih istraživanja udjela vezanih fenolnih spojeva u slami heljde. U istraživanju Meng i suradnika (2019) određeni su udjeli *p*-kumarinske kiseline i *t*-ferulinske u izlolu netopljivih vlakana slame heljde od, redosljedno, 817 $\mu\text{g g}^{-1}$ i 385 $\mu\text{g g}^{-1}$, što je više nego što je određeno u ovome radu. Općenito, udio vezanih fenolnih spojeva najveći je u perifernim tkivima sjemenki žitarica (Boz, 2015) pa se u tom smislu najviše istražuju posije žitarica i pseudožitarica. Iz dostupnih istraživanja zastupljenosti vezanih fenolnih spojeva u talijanskom ljuju, vidljiva je prisutnost različitih derivata ferulinske kiseline te *p*-kumarinske kiseline (Hartley, 1976), ali relevantni, noviji kvantitativni podaci nisu dostupni. S obzirom na značajne udjele, od ukupno približno 0,35 % suhe tvari, talijanski ljuj može se smatrati potencijalno vrijednim izvorom *t*-ferulinske i *p*-kumarinske kiseline.

4.2. UGLJIKOHIDRATNA FRAKCIJA TALIJANSKOG LJULJA I SLAME HELJDE

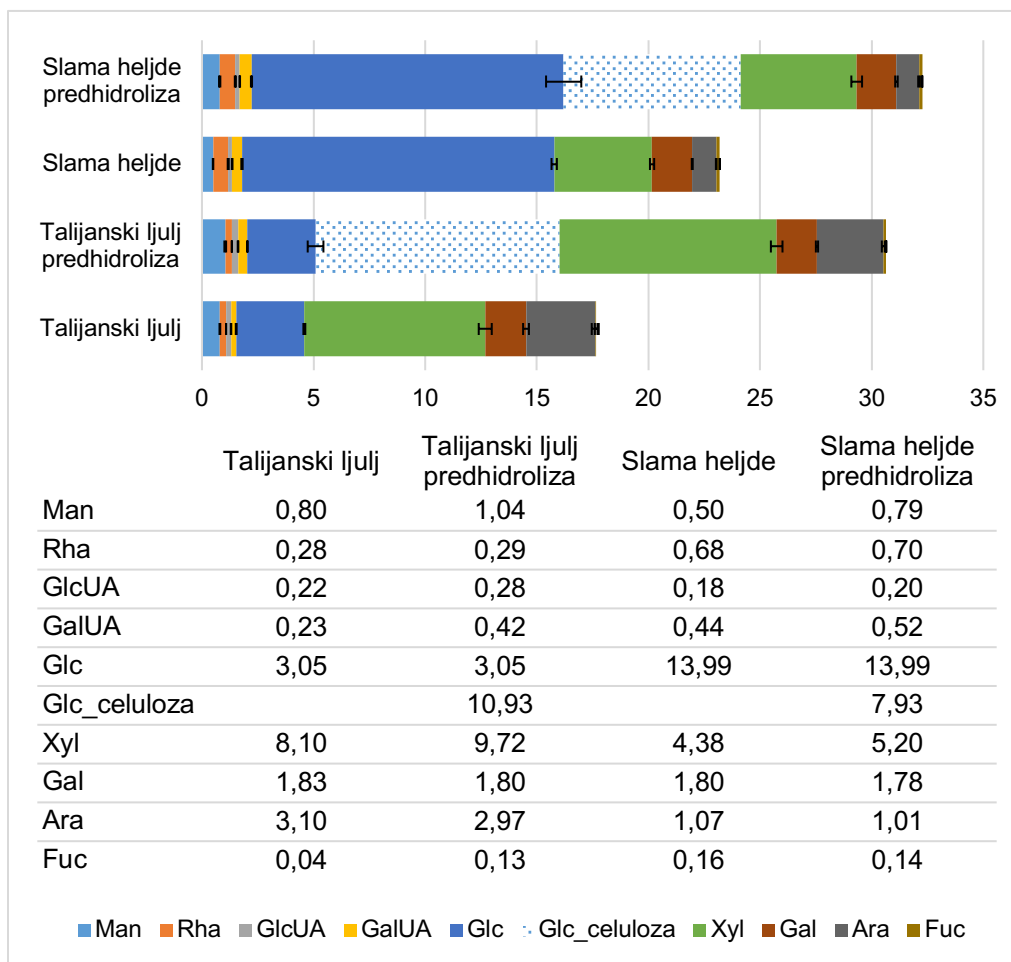
4.2.1. Monomerni sastav strukturnih polisaharida

Polisaharidi stanične stijenke imaju veliki potencijal za konverziju u različitim biotehnološkim procesima, a u prehrambenoj industriji mogu biti od velike važnosti zbog svojih potencijalnih funkcionalnih svojstava. Određivanjem monomernog sastava strukturnih polisaharida neke biljne sirovine, dobiva se uvid u najzastupljenije polisaharidne komponente kao osnova za planiranje strategija za njihovo izdvajanje i iskorištavanje.

Monomerni sastav strukturnih polisaharida talijanskog ljulja i slame heljde određen je HPLC-DAD tehnikom nakon PMP derivatizacije kiselinskih hidrolizata navedenih sirovina. Kiselinska hidroliza osigurala je oslobađanje monomera koji čine strukturne polisaharide. Pritom, učinjena je kiselinska hidroliza sa i bez prethodne prethidrolize, kojom se omogućila solubilizacija visokoorganiziranih struktura, poput celuloze. HPLC analizom određeno je 7 monosaharida: ramnoza (Rha), manoza (Man), glukoza (Glc), galaktoza (Gal), arabinoza (Ara) i fukoza (Fuc) te 2 uronske kiseline: glukuronska kiselina (GlcUA) i galakturonska kiselina (GalUA) (slika 14). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je su dominantni monomeri u sastavu strukturnih polisaharida glukoza i ksiloza, redosljedno u udjelima 14,3 % s.tv. i 9,7 % s.tv. u talijanskom ljulju te 21,9 % s.tv. i 5,2 % s.tv. u slami heljde. Usporedbom rezultata dobivenih sa i bez prethodne hidrolize, za svaki uzorak, vidljivo je da se većina polisaharida može relativno lako hidrolizirati u jednostavne šećere, približno 60 % u talijanskom ljulju, odnosno približno 17,5 % s.tv. i približno 72 % u slami heljde, odnosno približno 23 % s.tv. Općenito, udjeli ukupnih strukturnih ugljikohidrata (zbroy udjela svih monomera) bio je relativno nizak, približno 30,7 % s.tv. u talijanskom ljulju i približno 32,3 % s.tv. u slami heljde.

U radu Godlewska i Ciepiela (2020), udjeli neutralnih detergent vlakana (engl. neutral detergent fiber; predstavljaju zbroj udjela hemiceluloze, celuloze i lignina) iznosila su u prosjeku 37,6-50,8 % s.tv. tijekom eksperimenta. U zaključku istraživanja navode da se udjeli vlakana i njihova digestibilnost mogu modificirati primjenom različitih biostimulatora.

Na slici 15. istaknut je udio celulozne glukoze (označen točkastim uzorkom) koji je izračunat kao razlika udjela ukupnog glukana u uzorku dobivenog hidrolizom uz prethodnu predhidrolizu i ukupnog glukana u uzorku dobivenog hidrolizom bez predhidrolize, odnosno dio ukupnog glukana koji je mogao biti hidroliziran tek uz predhidrolizu, a što se odnosi na celulozu. Dio ukupnog glukana koji se mogao jednostavno hidrolizirati vjerojatno pripada hemicelulozi, odnosno ksiloglukanu. Približan udio hemiceluloze može se odrediti na temelju udjela ukupnih ksilana, arabinana i lako hidrolizabilnog glukana. Približan udio pektina može se odrediti prvenstveno na temelju udjela ukupnih galakturonana i ramnana, a također i dijela arabinana i galaktana.



Slika 14. Monomerni sastav strukturnih polisaharida talijanskog ljulja i slame heljde

4.2.2 Udio prehrambenih vlakana

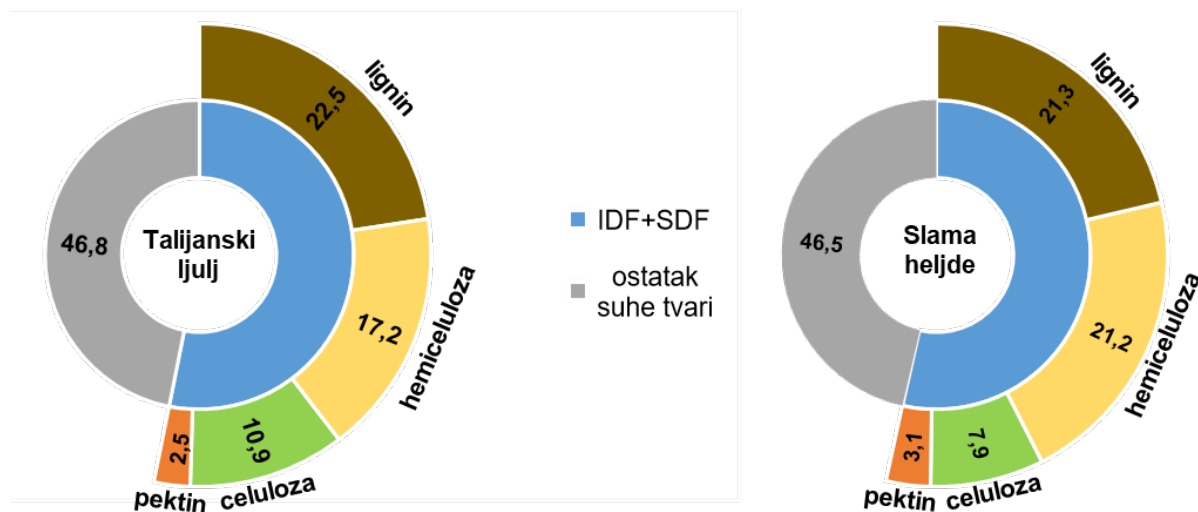
Udio prehrambenih vlakana velike molekulske mase određen je ezimsko-gravimetrijskom metodom te su zasebno određeni udjeli netopljivih (IDF - engl. insoluble dietary fibre) i topljivih (SDF - engl. soluble dietary fibre) vlakana (Tablica 5.).

Tablica 5. Udio netopljivih (IDF) i topljivih vlakana (SDF) velike molekulske mase u talijanskom ljulju i slami heljde

Uzorak	IDF (% s.tv.)	SDF (% s.tv.)
Talijanski ljulj	49,78 ± 1,04	3,39 ± 0,82
Slama heljde	49,06 ± 2,85	4,37 ± 0,24

Iz rezultata je vidljivo da oba uzorka sadrže gotovo jednak udio netopljivih, ali i topljivih vlakana, približno 50 % u suhoj tvari uzorka, te približno 3,4 % (talijanski ljulj), odnosno 4,4 % u suhoj tvari uzorka (slama heljde). Rezultati su u korelaciji s monomernim sastavom strukturnih polisaharida (slika 14) koji su ukazali na dominantnu zastupljenost celuloze i hemiceluloze. Udio topljivih vlakana najvjerojatnije se odnosi na udio pektina i mali dio hemiceluloze topljive pri uvjetima analize. Kombiniranjem udjela ukupnih vlakana (zbroj udjela netopljivih i topljivih vlakana) s monomernim sastavom strukturnih polisaharida, može se pretpostaviti približan udio lignina, celuloze i hemiceluloze kao glavnih sastavnica lignoceluloznih sirovina (slika 15).

Lignin je biopolimer aromatskih spojeva (monolignola) koji doprinosi otpornosti, čvrstoći i hidrofobnosti staničnih stijenki unutar koje je stabiliziran bliskim i jakim interakcijama s polisaharidima stanične stijenke, tvoreći netopljive komplekse. Stoga, lignin se kvantificira kao dio netopljivih vlakana (Fahey i sur., 2019). Iz razlike udjela ukupnih vlakana i udjela ukupnih strukturnih polisaharida, može se procijeniti udio lignina koji iznosi 22,5 % s.tv. u talijanskom ljulju, te 21 % s.tv. u slami heljde. Udio i sastav lignina važni su s aspekta planiranja hidrolitičkih postupaka sa ili bez djelomične ili potpune delignifikacije kako bi se povećala iskoristivost strukturnih polisaharida za izdvajanje ili biokonverziju. U radu Yasuda i suradnika (2015), određen je udio lignina u talijanskom ljulju od 23,5 % što je sukladno s rezultatom dobivenim u ovome radu.



Slika 15. Relativna zastupljenost lignina, hemiceluloze i celuloze u suhoj tvari talijanskog ljulja i slame heljde (IDF – netopljiva vlakna velike molekulske mase, SDF - topljiva vlakna velike molekulske mase)

Iz slike 15. vidljivo je da je dominantna polisaharidna frakcija u analiziranim sirovinama hemiceluloza, čiji udio se može procijeniti na 17,2 % s.tv. u talijanskom ljuđu i 21,2 % s.tv. u slami heljde. Pritom, s obzirom na monomerni sastav, hemicelulozu talijanskog ljuđa dominantno čini (glukurono)arabinoksilan, odnosno pentozni šećeri (ksiloza i arabinoza) čine približno 73 % hemiceluloze talijanskog ljuđa. U hemicelulozi slame heljde, pentoze čini približno tek 30 % hemiceluloze, dominantan polisaharid je ksiloglukan. Prisutnost β -glukana u ovom uzorku isključena je naknadnom analizom specijaliziranim setom (K-BGLU; Megazyme, Irska) (rezultati nisu prikazani). Udio celuloze u analiziranim sirovinama, sukladan je udjelu ukupnog glukana hidroliziranog nakon predhidrolize, te iznosi približno 11 % s.tv. u talijanskom ljuđu te približno 8 % s.tv. u slami heljde.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Dominantan slobodni polifenolni spoj u talijanskom ljulju i slami heljde bio je rutin, određen u koncentraciji $0,38 \text{ mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ u talijanskom ljulju i $6,43 \text{ mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ u slami heljde, a također je identificiran kvercetin u približno 7-10 puta manjim udjelima.
2. Povećanje udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu pozitivno je utjecalo na ekstraktabilnost slobodnih polifenolnih spojeva (rutina i kvercetina) te je njihova maksimalna koncentracija određena u ekstraktima pripremljenima s 80 %-tnim etanolom, za oba uzorka, a s time usporedno i najveći antioksidacijski kapacitet u istim ekstraktima.
3. U usporedbi ekstrakcijske učinkovitosti primijenjenih tehnika, konvencionalnom ekstrakcijom postignuti su veći prinosi ukupnih i pojedinačnih slobodnih polifenola te antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (MAE). Relativno usporedivi prinosi MAE postignuti su primjenom vremena ekstrakcije od 9 min, uz snagu mikrovalova od 250 W.
4. Talijanski ljulj se pokazao kao bogatiji izvor vezanih polifenolnih spojeva, određenih u udjelima $2,3 \text{ mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ za *t*-ferulinsku kiselinu i $1,01 \text{ mg g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ za *p*-kumarinsku kiselinu, dok je u slami heljde udio ovih spojeva bio približno 10 puta manji.
5. U metodologiji određivanja vezanih polifenolnih spojeva, primjena kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE-C18), u fazi pročišćavanja uzorka, pokazala je jednaku učinkovitost kao i referentna metoda, s prednošću jednostavnije i brže pripreme uzorka.
6. Udio strukturnih polisaharida u talijanskom ljulju i slami heljde bio je podjednak, približno 31-32 % s.tv., a dominantno ih čine ksiloza (Xyl), arabinoza (Ara) i glukoza (Glc) s udjelima u talijanskom ljulju: 14,3 % s.tv. (Xyl), 3,0 % (Ara), 9,7 % s.tv. (Glc), te u slami heljde 21,9 % s.tv. (Xyl), 1,0 % s.tv. (Ara) i 5,2 % s.tv. (Glc).
7. Hemiceluloza u talijanskom ljulju (17,2 % s.tv.) je dominantno arabinoksilanskog tipa dok je u slami heljde (21 % s.tv.) osim arabinoksilana prisutan značajan udio ksiloglukana. Udio celuloze u oba uzorka je bio relativno nizak (11 % s.tv. u talijanskom ljulju i 8 % s.tv. u slami heljde), dok je udio lignina u obje sirovine iznosio približno 22 % s.tv.

6. LITERATURA

- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA i Serna-Saldívar SO (2014) Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem* **152**, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Adachi T (1983) Observation of pollen tube elongation, fertilization and ovule development in autogamous autotetraploid buckwheat. U: Buckwheat Research, 2. izd., Miyazaki, Japan, str. 103-113.
- Alekseeva ES i Malikov VG (1992) The results of buckwheat green floret form. U: Buckwheat 5. izd., Taiyuan, China, Agriculture Publishing House, str. 20-26.
- Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt EK i Gallagher E (2010) Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem* **119(2)**, 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.032>
- Annunziata G, Jiménez-García M, Capó X, Moranta D, Arnone A, Tenore GC, Sureda A i Tejada S (2020) Microencapsulation as a tool to counteract the typical low bioavailability of polyphenols in the management of diabetes. *Food Chem Toxicol* **139**, 111248–111248. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111248>
- Anonymus 1 (2024) Talijanski ljulj (*Lolium multiflorum*) u polju Ijulja. https://www.sjemenarna-ri.hr/hr/talijanski_ljulj_lolium_multiflorum_lam/405/66. Pristupljeno 2. rujna 2024.
- Anonymus 2 (2024) Talijanski ljulj (mnogocvijetni ljulj) – Agroklub. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/krmno-bilje/ljulj-talijanski-mnogocvijetni-ljulj-48/>. Pristupljeno 2. rujna 2024.
- Anonymus 3 (2024) *Fagopyrum esculentum* Moench. <https://pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Fagopyrum+esculentum>. Pristupljeno 2. rujna 2024.
- Anonymus 4 (2024) Kemijska struktura kvercetina. <https://sr.wikipedia.org/sr/Kvercetin>. Pristupljeno 2. rujna 2024.
- Arruda HS, Pereira GA i Pastore GM (2016) Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Anal Method* **10(1)**, 100–110. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0554-y>
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN i Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117(4)**, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azwanida N (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Wag Ur Fron* **04(03)**. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Biesaga M (2011) Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J Chromatogr A*, **1218**, 2505–2512. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059>.
- Boo YC (2019) p-Coumaric Acid as An Active Ingredient in Cosmetics: A Review Focusing on its Antimelanogenic Effects. *Antioxidants*, **8(8)**, 275. <https://doi.org/10.3390/antiox8080275>
- Božac N (2018) Nove tehnologije izolacije fenolnih spojeva iz kome maslina (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME i Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci Tech-Brazil* **28(1)**, 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž i Bren U (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21(7)**, 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Bugg RL i Dutcher JD (1989) Warm-Season Cover Crops for Pecan Orchards: Horticultural and Entomological Implications. *Biol Agric Hortic* **6(2)**, 123–148. <https://doi.org/10.1080/01448765.1989.9754511>

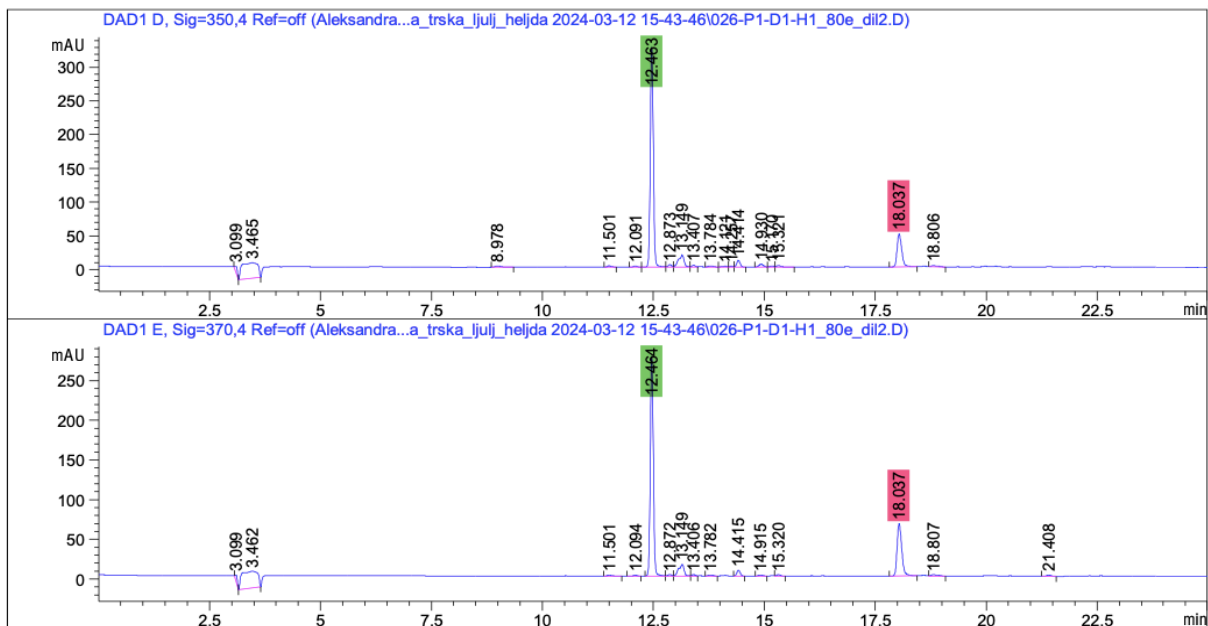
- Calderon-Montano J, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C i Lopez-Lazaro M (2011) A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Rev Med Chem* **11(4)**, 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>
- Choi K-C, Son Y-O, Hwang J-M, Kim B-T, Chae M i Lee J-C (2016) Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum*. *Pharm Biol* **55(1)**, 611–619. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1266673>
- Choi K-C, Son Y-O, Hwang J-M, Kim B-T, Chae M i Lee J-C (2016) Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum*. *Pharm Biol* **55(1)**, 611–619. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1266673>
- Christa K i Soral-Šmietana M (2008) Buckwheat grains and buckwheat products – nutritional and prophylactic value of their components – a review. *Czech J Food Sci* **26**(No. 3), 153–162. <https://doi.org/10.17221/1602-cjfs>
- Compton DL, Laszlo JA i Evans KO (2012) Antioxidant properties of feruloyl glycerol derivatives. *Ind Crop Prod* **36(1)**, 217–221. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.009>
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B i Masella R (2010) Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int J Mol Sci* **11(4)**, 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Das S, Bora N, Rohman MA, Sharma R, Jha AN i Singha Roy A (2018) Molecular recognition of bio-active flavonoids quercetin and rutin by bovine hemoglobin: an overview of the binding mechanism, thermodynamics and structural aspects through multi-spectroscopic and molecular dynamics simulation studies. *Phys Chem Chem Phys* **20(33)**, 21668–21684. <https://doi.org/10.1039/c8cp02760a>
- Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S i Sarker SD (2012) Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Method Mol Biol (Clifton, N.J.)* **864**, 89–115. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_5
- Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C i Restani P (2021) Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* **13(1)**, 273. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>
- Dmitrienko SG, Kudrinskaya VA i Apyari VV (2012) Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *J Anal Chem+* **67(4)**, 299–311. <https://doi.org/10.1134/s106193481204003x>
- Dohi H, Yamada A i Fukukawa T (1997) Intake Stimulants in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) Fed to Sheep. *J Dairy Sci* **80(9)**, 2083–2086. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(97\)76153-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(97)76153-8)
- Dragović-Uzelac V, Elez-Garofulić I, Jukić M, Penić M i Dent M (2012) The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.) Polyphenols. *Food Tech Biotech* **50(3)**, 377–383.
- El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson A-K i Verpoorte R (2012) Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *J Agr Food Chem* **60(44)**, 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>
- Fahey GC, Novotny L, Layton B, Martens D (2019) Critical factors in determining fiber content of feeds and foods and their ingredients. *J AOAC Int* **102**, 52-62. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0067>
- FAOSTAT (2024). Baza podataka Food and Agricultural Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/metadata>. Pristupljeno 4. rujna 2024.
- Godlewska A, Ciepiela GA (2021) Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) Fiber fraction content and dry matter digestibility following biostimulant application against the background of varied nitrogen regime. *Agronomie* **11**, 39. <https://dx.doi.org/10.3390/agronomy11010039>
- Handa SS (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. U: Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (ured.) *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, ICS-UNIDO, Trst, Italija, str. 22.

- Hannaway DB, Fransen S, Cropper JB, Teel M, Chaney M, Griggs T i sur. (1999). *Annual ryegrass (Lolium multiflorum Lam.)*. https://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative_report_or_publications/cf95jb75s
Pristupljeno 4. rujna 2024.
- Hartley RD, Jones EC (1976) Diferulic acid as a component of cell walls of *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* **15**, 1157-1160. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(76\)85121-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(76)85121-7)
- Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM i Lines TC (2007) A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*, **45(11)**, 2179–2205. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.015>
- Inglett GE, Chen D, Berhow M i Lee S (2011) Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chem* **125(3)**, 923–929. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.076>
- Jukić M, Đaković S, Filipović-Kovačević Ž, Kovač V i Vorkapić-Furač J (2005) Dominantni trendovi "zelene" kemije. *Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske* **54(5)**, 255-272.
- Kalinová JP, Vrchatová N, Tríska J (2019) Phenolics levels in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) achenes. *J Cereal Sci* **85**, 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.12.012>
- Kondratyuk TP i Pezzuto JM (2004) Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharm Biol* **42(sup1)**, 46–63. <https://doi.org/10.3109/13880200490893519>
- Kreft I, Zhou M, Golob A, Germ M, Likar M, Dziedzic K i Luthar Z (2020) Breeding buckwheat for nutritional quality. *Breeding Sci* **70(1)**, 67–73. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19016>
- Kreft S, Knapp M i Kreft I (1999) Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis. *J Agr Food Chem* **47(11)**, 4649–4652. <https://doi.org/10.1021/jf990186p>
- Kumar N i Pruthi V (2014) Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnol Reports* **4**, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Kuppusamy P, Lee KD, Song CE, Ilavenil S, Sriganpalram S, Arasu MV i Choi KC (2018) Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Rev Bras Farmacogn* **28(3)**, 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>
- Lee J i Mitchell AE (2012) Pharmacokinetics of Quercetin Absorption from Apples and Onions in Healthy Humans. *J Agric Food Chem* **60(15)**, 3874–3881. <https://doi.org/10.1021/jf3001857>
- Lee SY, Lee SJ, Yim DG i Hur SJ (2020) Changes in the Content and Bioavailability of Onion Quercetin and Grape Resveratrol During In Vitro Human Digestion. *Foods* **9(6)**, 694. <https://doi.org/10.3390/foods9060694>
- Lesjak M, Beara I, Simin N, Pintač D, Majkić T, Bekvalac K, Orčić D i Mimica-Dukić N (2018) Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J Funct Foods*, **40**, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>
- Luque de Castro MD i García-Ayuso L E (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta* **369(1-2)**, 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(98)00233-5)
- Ma Q, Yu Y, Zhou Z, Wang L i Cao R (2023) Effects of different treatments on composition, physicochemical and biological properties of soluble dietary fiber in buckwheat bran. *Food Bioscience* **53**, 102517–102517. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102517>
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C i Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79(5)**, 727–747. doi:<https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mancuso C i Santangelo R (2014) Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol* **65**, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.024>

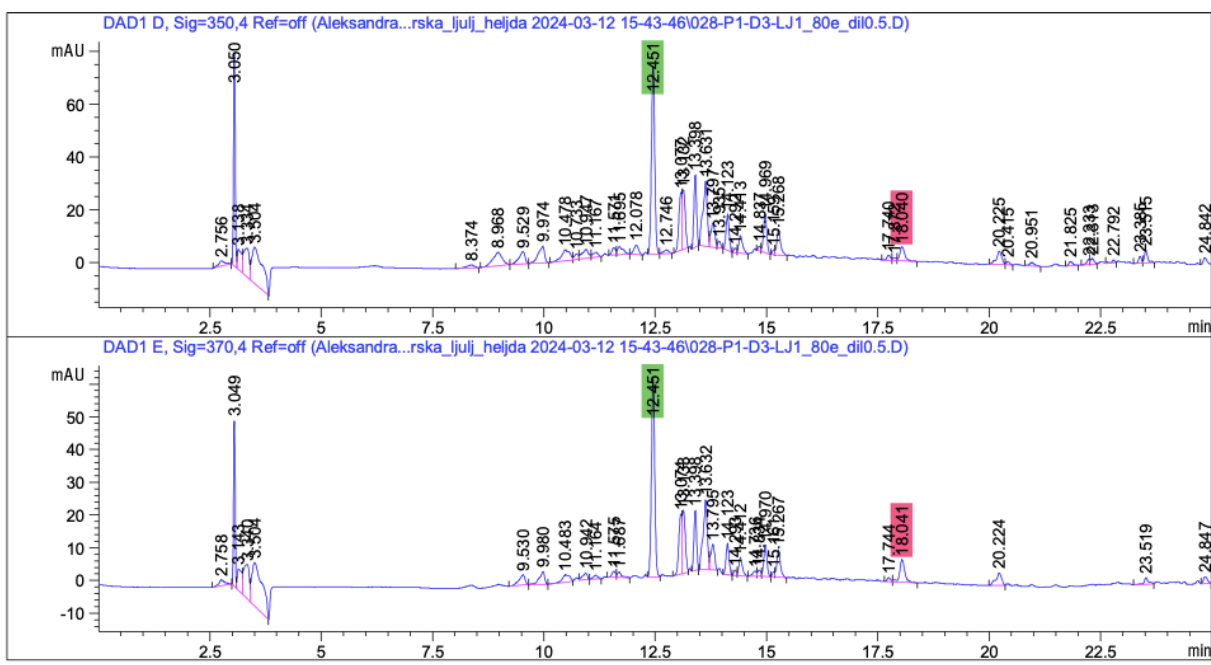
- Marshall HG (1969) Isolation of Self-Fertile, Homomorphic Forms in Buckwheat, *Fagopyrum sagittatum* Gilib 1. *Crop Sci* **9(5)**, 651–653. <https://doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183x000900050044x>
- McCleary BV (2014) Modification to AOAC Official Methods 2009.01 and 2011.25 to Allow for Minor Overestimation of Low Molecular Weight Soluble Dietary Fiber in Samples Containing Starch. *J AOAC Int* **97(3)**, 896–901. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-406>
- Meng X, Liu F, Xiao Y, Cao J, Wang M, Duan X (2019) Alterations in physicochemical and functional properties of buckwheat straw insoluble dietary fiber by alkaline hydrogen peroxide treatment. *Food Chem:X* **3**, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100029>
- Mirković M (2016) Primjena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom u izolaciji polifenolnih spojeva iz korijena i lista maslačka (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Olivares-Vicente M, Barrajon-Catalan E, Herranz-Lopez M, Segura-Carretero A, Joven J, Encinar JA i Micol V (2018) Plant-Derived Polyphenols in Human Health: Biological Activity, Metabolites and Putative Molecular Targets. *Curr Drug Metab* **19(4)**, 351–369. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180220095236>
- Oomah BD, Campbell CG i Mazza G (1996) Effects of cultivar and environment on phenolic acids in buckwheat. *Euphytica* **90(1)**, 73–77. <https://doi.org/10.1007/bf00025162>
- Ou S i Kwok K-C (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agric* **84(11)**, 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- Padmore J M (1990b) Animal feed - AOAC official method 976.05 - Protein (crude) in animal feed, automated Kjeldhal method. U: Helrich K (ured.) Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15. izd., AOAC International, Arlington, VA, str. 72.
- Padmore JM (1990a) Animal feed - AOAC official method 942.05 - Ash of animal feed. U: Helrich K (ured.) Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15. izd., AOAC International, Arlington, VA, str. 70.
- Pei K, Ou J, Huang J i Ou S (2016) p -Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric* **96(9)**, 2952–2962. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7578>
- Rondini L, Peyrat-Maillard M-N, Marsset-Baglieri A i Berset C (2002) Sulfated Ferulic Acid Is the Main in Vivo Metabolite Found after Short-Term Ingestion of Free Ferulic Acid in Rats. *J Agric Food Chem* **50(10)**, 3037–3041. <https://doi.org/10.1021/jf011295i>
- Rosazza JPN, Huang Z, Dostal L, Volm T i Rousseau B (1995) Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. *J Ind Microbiol* **15(6)**, 457–471. <https://doi.org/10.1007/bf01570016>
- Semwal D, Semwal R, Combrinck S i Viljoen A (2016) Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients* **8(2)**, 90. <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
- Singleton VL i Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Viticult* **16(3)**, 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós M (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* **299**, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Song Y, Wu T, Yang Q, Chen X, Wang M, Wang Y, Peng X i Ou S (2014) Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. *J Funct Foods* **9**, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.007>
- Sparr Eskilsson C i Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A* **902(1)**, 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
- Sun R-C, Sun X-F i Zhang S-H (2001) Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood. *J Agric Food Chem* **49(11)**, 5122–5129. <https://doi.org/10.1021/jf010500r>

- Tilay A, Bule M, Kishenkumar J i Annapure U (2008) Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. *J Agric Food Chem* **56(17)**, 7644–7648. <https://doi.org/10.1021/jf801536t>
- Valan Arasu M, Ilavenil S, Kim DH, Roh SG, Lee J-C i Choi KC (2014) In Vitro and In Vivo Enhancement of Adipogenesis by Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in 3T3-L1 Cells and Mice. *Plos one* **9(1)**, e85297–e85297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085297>
- Vogel J (2008) Unique aspects of the grass cell wal. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.002>
- Vojvodić Cebin A, Komes D i Ralet M-C (2022) Development and Validation of HPLC-DAD Method with Pre-Column PMP Derivatization for Monomeric Profile Analysis of Polysaccharides from Agro-Industrial Wastes. *Polymers* **14(3)**, 544. <https://doi.org/10.3390/polym14030544>
- Williams CA i Grayer RJ (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* **21(4)**, 539. <https://doi.org/10.1039/b311404j>
- XU C-C, WANG B, PU Y-Q, TAO J-S i ZHANG T (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin J Nat Medicines* **15(10)**, 721–731. [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(17)30103-6)
- Yang G-J, Xu J-J, Chen H-Y i Leng Z-Z (2004) Studies on the interaction between rutin and DNA in the absence and presence of β -cyclodextrin by electrochemical and spectroscopic methods. *Chin J Chem* **22(11)**, 1325–1329. <https://doi.org/10.1002/cjoc.20040221122>
- Yasuda M, Takenouchi Y, Nitta Y, Ishii Y, Oht K (2015) Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) as a high-potential bio-ethanol resource. *Bioenerg Res* **8**, 1303–1309. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9582-5>
- Zhao Z i Moghadasian MH (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem* **109(4)**, 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>

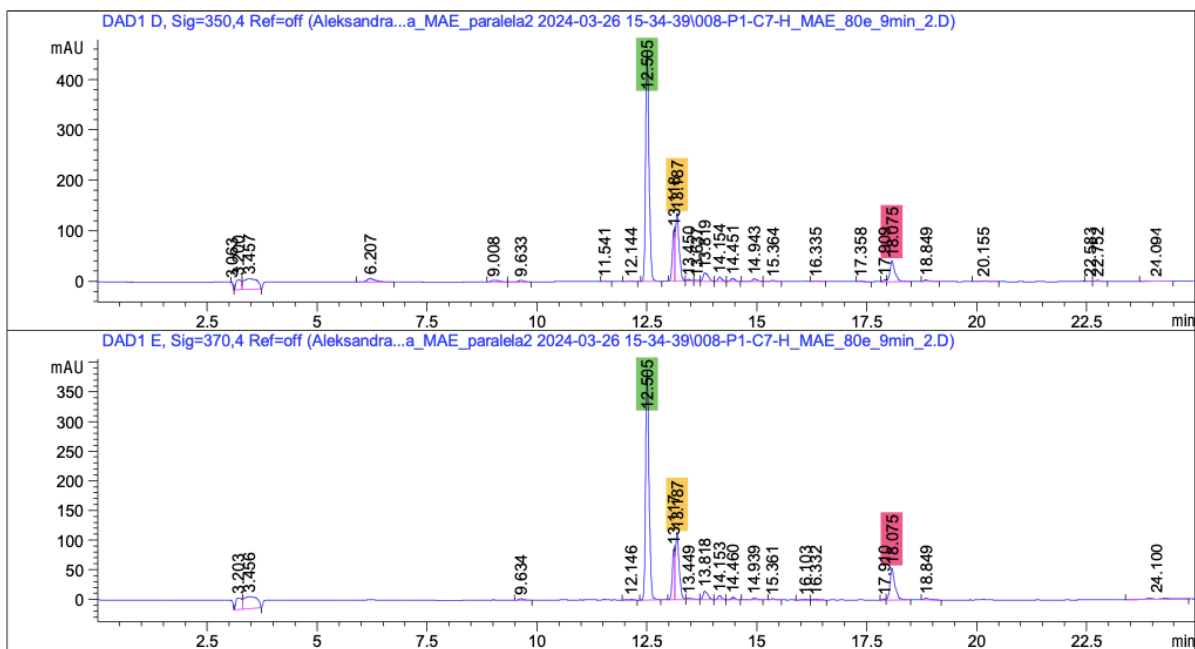
7. PRILOZI



Prilog 1. Kromatogram ekstrakta slame heljde (konvencionalna ekstrakcija, 80 %-tni etoh, razrijeđen 2x); retencijsko vrijeme rutina – 12,5 min, retencijsko vrijeme kvercetina – 18 min



Prilog 2. Kromatogram ekstrakta talijanskog ljulja (konvencionalna ekstrakcija, 80 %-tni etoh, razrijeđen 0,5x); retencijsko vrijeme rutina – 12,5 min, retencijsko vrijeme kvercetina – 18 min



Prilog 3. Kromatogram ekstrakta slame heljde (MAE – 9 min, 80 %-tni etoh); retencijsko vrijeme rutina – 12,5 min, retencijsko vrijeme kvercetin-3-glikozida - 13,2 min, retencijsko vrijeme kvercetina – 18 min

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis