

Razvoj postupka ekstrakcije polifenolnih antioksidansa iz ljekovitih biljnih vrsta vodom

Buljat, Ana Maria

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:463354>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ana Maria Buljat

6686/PT

**RAZVOJ POSTUPKA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH
ANTIOKSIDANSA IZ LJEKOVITIH BILJNIH VRSTA
VODOM**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija uživala

Mentor: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Završni rad

RAZVOJ POSTUPKA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH ANTIOKSIDANSA IZ LJEKOVITIH BILJNIH VRSTA VODOM

Ana Maria Buljat, 6686/PT

Sažetak: Primjena ljekovitih biljnih vrsta u svrhu izdvajanja njihovih bioaktivnih sastojaka, potaknula je mnogobrojna istraživanja učinkovitosti ekstrakcijskih postupaka, no, sve je veći interes za razvojem jednostavnih i lako primjenjivih postupaka ekstrakcije primjenom vode kao otapala. Cilj ovog rada bio je razviti postupak ekstrakcije 5 ljekovitih biljnih vrsta (gospina trava, neven, preslica, maslina i lipa) kombinacijom različitih parametara ekstrakcije; temperature, trajanja, veličine čestica i brzine miješanja. Udjel ukupnih polifenola određen je spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijski kapaciteti ekstrakata primjenom ABTS, DPPH i FRAP metoda. Među različitim kombinacijama parametara ekstrakcije, najučinkovitijim se pokazala kombinacija parametara ekstrakcije s temperaturom od 80 °C, vremenom ekstrakcije od 30 minuta, veličinama čestica biljnog materijala manjim od 100 µm te brzinom miješanja od 500 rpm što je rezultiralo ekstraktima s najvišim udjelom ukupnih polifenola te najvišim antioksidacijskim kapacitetom. Primjenom navedene kombinacije parametara ekstrakcije najveći prinos ekstrakcije određen je u ekstraktu nevena (1,00%), a najmanji prinos zabilježen je u ekstraktu lipe (0,61%). Također, primjenom istih parametara ekstrakcije, najveći udjel ukupnih polifenola određen je u ekstraktu gospine trave (92,70 mg GAE/g biljnog materijala), dok je najmanji udjel ukupnih polifenola utvrđen kod ekstrakta preslice (31,89 mg GAE/g biljnog materijala). Između rezultata prinosa ekstrakcije i udjela ukupnih polifenola nije utvrđena linearna korelacija, što ukazuje na prisutnost većeg udjela drugih topljivih sastojaka u dobivenim ekstraktima, no, uočena je visoka linearna korelacija između polifenolnih spojeva i antioksidacijskih svojstava što dokazuje da su polifenolni spojevi primarno odgovorni za antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, ekstrakcija, ljekovite biljne vrste, polifenoli

Rad sadrži: 39 stranica, 16 slika, 4 tablica, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Ana Belščak-Cvitanović

Rad predan: srpanj 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Final work

DEVELOPMENT OF THE EXTRACTION PROCEDURE OF POLYPHENOLIC ANTIOXIDANTS FROM MEDICINAL PLANTS USING WATER

Ana Maria Buljat, 6686/PT

Abstract: The use of medicinal plants for the purpose of isolation and recovery of their bioactive compounds, has been the subject of numerous scientific studies on different extraction techniques, however, an increasing interest arised for the development of simple and easily applicable extraction methods by using water as the solvent. The aim of this study was to develop the extraction procedure of bioactive compounds from 5 medicinal plants (St. John's wort, marigold, horsetail, olive leaf and linden) using a combination of different extraction parameters; temperature, duration, particle size and agitation speed. The content of total polyphenols was determined spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu method and antioxidant capacity of extracts was measured by the ABTS, DPPH and FRAP assays. Among the various combinations of extraction parameters, the combination of 80°C as the temperature, time of 30 minutes, the particle size of plant material less than 100 microns, and the agitation speed of 500 rpm was revealed as the most effective, resulting in extracts with the highest content of total polyphenols and antioxidant capacity. By using this combination of extraction parameters, the highest extraction yield was determined in marigold extract (1.00%), and the lowest in linden extract (0.61%). Also, using the same extraction parameters, the highest content of total polyphenols was determined in St. John's Wort extract (92.70 mg GAE/g plant material), and the lowest in horsetail extract (31.89 mg GAE/g plant material). Among the extraction yield and total polyphenols content no linear correlation was established, indicating on the significant proportion of other soluble ingredients in the obtained extracts apart from polyphenols, however, a high linear correlation between the polyphenolic content and antioxidant capacity confirmed that polyphenolic compounds are primarily attributed for the potent antioxidant capacity of plant extracts.

Keywords: antioxidant capacity, extraction, medicinal plants, polyphenols

Thesis contains: 39 pages, 16 figures, 4 tables, 55 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. Draženka Komes, PhD

Technical support and assistance: Assist. Prof. Ana Belščak-Cvitanović, PhD

Thesis delivered: July, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te u Laboratoriju za mjerenje i automatizaciju, Zavoda za procesno inženjerstvo, kao dio istraživanja u sklopu znanstvenog projekta financiranog od strane europskog socijalnog fonda, programa *Unaprijeđenje ljudskih potencijala* pod nazivom “**Praćenje antioksidacijske aktivnosti samoniklog bilja primjenom mikroreaktora (MICRO-AA)**”.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Primjena ljekovitih biljnih vrsta u liječenju bolesti	2
2.1.1. Ljekovite biljne vrste u Hrvatskoj	2
2.1.2. Najrasprostranjenije ljekovite biljne vrste u Hrvatskoj i njihovo djelovanje na zdravlje	3
2.2. Polifenolni spojevi kao bioaktivni sekundarni biljni metaboliti ljekovitih biljnih vrsta	6
2.3. Ekstrakcija	7
2.3.1. Uvjeti ekstrakcije	8
2.3.2. Primjena vode kao otapala za ekstrakciju polifenola	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijal	12
3.1.1. Priprema ekstrakata	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Određivanje prinosa ekstrakcije	13
3.2.2. Folin-Ciocalteu metoda određivanja ukupnih polifenola	14
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	15
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	17
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	18
3.2.6. Statistička obrada podataka	19
4. REZULTATI	20
4.1. Prinos ekstrakcijskih eksperimenata biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije	21
4.2. Udjel ukupnih polifenola u biljnim ekstraktima	22
4.3. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom	23
4.4. Antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom	24
4.5. Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom	25
4.6. Statistička analiza podataka – korelacijski koeficijenti i analiza glavnih komponenti	26
5. RASPRAVA	28
5.1. Prinos ekstrakcije	28
5.2. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na udjel ukupnih polifenola	28
5.3. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen ABTS metodom	29
5.4. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen DPPH metodom	30
5.5. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen FRAP metodom	31
5.6. Korelacije	31
5.7. Statistička analiza glavnih komponenata (PCA metoda)	32
6. ZAKLJUČCI	34
7. LITERATURA	35

1. UVOD

Ljekovite biljne vrste primjenjuju se već tisućama godina u prehrani ljudi te primarno zbog njihovog utjecaja na ljudski organizam te zdravstvenih učinaka koji ne potječu isključivo od osnovnog nutritivnog sastava biljke. Većina ljekovitih biljnih vrsta je najbogatiji prirodni izvor bioaktivnih spojeva u proizvodnji lijekova za tradicionalnu medicinu, funkcionalnih prehrambenih proizvoda, farmaceutskih međuprodukata te dodataka prehrani (Handa i sur., 2008). Ljekoviti biljni proizvodi i suplementi danas se koriste na potpuno drugačiji način nego u tradicionalnim medicinskim sustavima prastare Kine, Europe ili domorodačkih američkih plemena. Tadašnji su poznavaoi biljne medicine („vračevi“) koristili korijenje, lišće, koru, cvjetove i sjemenke biljaka kako bi pripremili infuzije (napitke), uvarke, kupke, tinkture, obloge i sl. (Blumenthal Med, 1998). Danas se visoko pročišćeni ekstrakti modificiraju u različite farmaceutske oblike koji predstavljaju temelj moderne biljne medicine ili fitoterapije. Proveden je velik broj iznimno opsežnih istraživanja kako bi se dokazala učinkovitost moderne biljne medicine, no jedan od glavnih izazova još uvijek je korištenje dobro definiranih i standardiziranih biljaka i biljnih sastojaka. Prvi korak u proizvodnji biljnih pripravaka je industrijska prerada ljekovitih biljnih vrsta, koja započinje s ekstrakcijom bioaktivnih sastojaka upotrebom različitih ekstrakcijskih tehnika. Neke od najkorištenijih tehnika ekstrakcije ljekovitih biljnih vrsta su maceracija, infuzija, dekokcija, digestija, perkolacija, ekstrakcija po Soxhletu, vodeno-alkoholna ekstrakcija fermentacijom, protustrujna ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima, ekstrakcija ultrazvukom i ekstrakcija superkritičnim fluidima. Međutim, problemi vezani uz dobivanje kvalitetnih biljnih ekstrakata, kao što su nedostatak konzistencije pri ekstrakciji, sigurnost primjene i djelotvornost, zasjenjuju potencijalne zdravstvene prednosti biljnih ekstrakata, a jedan od glavnih uzroka tih problema povezan je s nedostatkom jednostavnih i pouzdanih analitičkih tehnika i uvjeta ekstrakcije biljnih materijala (Huie, 2002).

Cilj ovog rada je kombinacijom različitih parametara ekstrakcije razviti jednostavan i visoko učinkovit postupak ekstrakcije polifenolnih spojeva iz 5 ljekovitih biljnih vrsta kao modelnih sustava. Kao parametri ekstrakcije varirani su vrijeme (duljina trajanja) ekstrakcije, temperatura, veličina čestica biljnog materijala te brzina miješanja. Za karakterizaciju ekstrakcijske učinkovitosti pojedine kombinacije parametara ekstrakcije određivani su prinosi ekstrakcije, udjel ukupnih polifenola u Folin-Ciocalteu metodom, antioksidacijski kapaciteti izmjereni ABTS, DPPH i FRAP metodama te je provedena statistička obrada rezultata primjenom analize glavnih komponenti (PCA analiza).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Primjena ljekovitih biljnih vrsta u liječenju bolesti

Kao posljedica modernog, ubrzanog načina života te prekomjernog korištenja sintetičkih lijekova, potrošači se danas sve češće oslanjaju na alternativne načine liječenja, posebice upotrebu ljekovitih biljnih vrsta. Od davnina se ljekovite biljne vrste koriste kao pomoć u liječenju različitih bolesti te je tako otac medicine, antički liječnik Hipokrat (460. pr. Kr.– 380. pr. Kr.) vjerovao u moć ljekovitih biljaka te u liječenju primjenjivao biljke koje su ljudi koristili stoljećima (Žuškin i sur., 2013).

Kao razlog sve intenzivnoj primjeni ljekovitih biljnih vrsta u liječenju bolesti, navodi se česta pojava negativnih posljedica na ljudsko zdravlje uzrokovanih korištenjem sintetičkih lijekova. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) 65-80% svjetskog stanovništva koristi konvencionalnu medicinu kao primarni oblik zaštite, ali trend uporabe biljaka u liječenju bolesti odnosno, tzv. fitoterapija, u sve je većem porastu (Jonas, 1997). Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), ljekovite biljne vrste su biljke čiji jedan ili više biljnih dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u terapijske svrhe ili kemijsko-farmaceutske sinteze, što je razlog sve većem uzgoju takvih ljekovitih biljnih vrsta. Fitoterapija je metoda liječenja, ublažavanja te sprječavanja bolesti i tegoba upotrebom cijelih ljekovitih biljaka ili njihovih dijelova (cvjetova, listova, korijena, itd.) te upotrebom sastojaka (eteričnih ulja, ekstrakata i drugih izolata) kao i gotovih pripravaka (čajeva, tinktura, masti, kapsula).

2.1.1. Ljekovite biljne vrste u Hrvatskoj

U posljednje vrijeme raste interes za proizvodnju i skupljanje ljekovitih i aromatičnih biljnih vrsta u svijetu, pa tako i u Hrvatskoj. Geografsko područje i mediteranska klima omogućili su da se u Hrvatskoj uspješno uzgaja i prikuplja oko 170 vrsta ljekovitih i aromatičnih biljnih vrsta (Pohajda i sur., 2009). U Hrvatskoj su najčešći proizvođači ljekovitih i aromatičnih biljnih vrsta obiteljska poljoprivredna gospodarstva (OPG) te se procjenjuje da proizvodnja ljekovitih i aromatičnih biljnih vrsta iznosi oko 3.000 ha, od čega oko 90% spada u proizvodnju kamilice, a ostalo uglavnom na lavandu, paprenu metvicu, matičnjak, komorač, sljez i neven (Mihovilović, 2013).

2.1.2. Najrasprostranjenije ljekovite biljne vrste u Hrvatskoj i njihovo djelovanje na zdravlje

Neven (*Calendula officinalis* L.)



Neven je jednogodišnja zeljasta biljka čija je stabljika uspravna, a listovi su duguljastog jajastog oblika. Cvjetovi su karakteristične žute ili narančaste boje (slika 1). Visina same biljke iznosi od 30 do 50 cm, a cvjeta od proljeća do jeseni. Najviše se koristi u terapiji gnojnih rana i posjekotina, kod krasta i osipa te nagnječenja i masnice.

Slika 1. Cvijet nevena (Anonymous 1, <http://www.cuvarkuca.hr/preporuka/neven-biljka-koze>)

Gospina trava (*Hypericum perforatum* L.)



Gospina trava je višegodišnja zeljasta biljka čija je stabljika uspravna s dva izdužena brida, a listovi ovalni i nasuprotni sa svjetlucajućim žutim točkicama (slika 2). Biljka može narasti na visine od 30 do 50 cm te raste na strminama, uz rubove šuma ili puteva. Najčešće se koristi kod živčanih tegoba svih vrsta, jedan je od najpoznatijih prirodnih antidepresiva (Linde i sur., 2008) te je odličan lijek za ublažavanje različitih probavnih smetnji.

Slika 2. Gospina trava (Anonymous 2, <http://covermagazin.com/caj-gospina-trava.htm>)

Maslina (*Olea europaea* L.)



Maslina je višegodišnja biljka karakteristična za sredozemno podneblje. Drvo masline može narasti i do 10 m u visinu. Listovi su duguljasti, kožasti, cijelog ili podvijenog ruba, a plodovi masline (slika 3) su karakteristične tamnoplave ili zelene boje. Listovi masline mogu se upotrebljavati za pripravku čaja koji se koristi za sniženje krvnog tlaka (Saber i sur., 2008) i regulaciju šećera u krvi (Soriguer i sur., 2013).

Slika 3. Plod masline (Anonymous 3, <http://www.privredni.hr/losija-godina-za-maslinare>)

Lipa (*Tilia* L.)



Lipa je drvo visine od 25 do 30 m s razvijenom krošnjom te sadrži blijedo žute cvjetove (slika 4) koji su skupljeni u cvat. Raste u šumama, sadi se u parkovima i drvorecima uz putove. U ljekovite svrhe najčešće se koristi infuzija cvijeta lipa protiv anksioznosti, protiv grlobolje te pospješivanja znojenja kod bolesti.

Slika 4. Cvijet lipa (Anonymous 4, <http://zenstvena.com/sve-prednosti-caja-od-lipa>)

Lavanda (*Lavandula officinalis* L.)



Lavanda je nizak grm visine od 50 do 80 cm. Stabljike su mnogobrojne i dlakave, a listovi su linearno šiljasti. Cvjetovi (slika 5) su prisutni tijekom ljeta, grupirani su u vršne klasove nježne ljubičaste boje te su vrlo ugodnog mirisa. U terapijske svrhe najčešće se koristi eterično ulje koje djeluje smirujuće i antidepresivno te stimulira cirkulaciju. Također poznata je primjena lavande u kulinarstvu kao začina i konzervans.

Slika 5. Cvijet lavande (Anonymous 5, <http://www.kleraderm.com/prodotti-2/olii-essenziali>)

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.)



Majčina dušica (slika 6) je grmolika biljka visine od 20 do 30 cm. Ima uske sivo-zelene listiće s kratkim peteljka, a na vrhovima stabljike nalaze se rozi do lila cvjetovi jakog i aromatičnog mirisa. Raste na sunčanim stranama padina jer joj je potrebno mnogo svjetlosti i topline. Ljekoviti sastojci nalaze se u listu i cvijetu majčine dušice, a preporuča se za liječenje bronhitisa, bronhijalnog katara, upale grla, a posebno je djelotvorna u ublažavanju kašlja.

Slika 6. Majčina dušica (Anonymous 6, https://hr.wikipedia.org/Maj%C4%8Dina_du)

Menta (*Mentha* L.)



Menta je aromatična biljka visine od 10 do 120 cm. Stablo joj je razgranato i obraslo nasuprotnim ovalno jajastim listovima s nazubljenim rubom koji su većinom tamnozeleno boje (slika 7). Dugolisna metvica (*Mentha longifolia* L.) ima vrlo široku upotrebu u narodnoj medicini, prehrambenoj te kozmetičkoj industriji. Dokazano je da eterično ulje i ekstrakt metvice imaju antioksidacijsko, antibakterijsko i antivirusno djelovanje (Hajlaoui i sur., 2009).

Slika 7. Menta (Anonymous 7, <http://www.uskinfo.ba/ljekovitiye-biljke-metvica-menta>)

Kadulja (*Salvia officinalis* L.)



Kadulja je višegodišnja razgranata biljka visine od 50 do 90 cm. Listovi su srebrno zelene boje te uski i sitno naborani, a cvjetovi su plavo-ljubičaste boje (slika 8). Raste u kamenitim i neplodnim mjestima, a može se uzgajati u vrtu. Primjenjuje se u liječenju upale grla te za ispiranje usta i grla. U dugotrajnom korištenju kadulje moguće su neželjene posljedice kao što su: vrtoglavica, povraćanje, epileptični napadaji, drhtavica (Karalliedde i Gawarammana, 2008).

Slika 8. Kadulja (Anonymous 8, <http://www.val-znanje.com/ljekovite-biljke/kadulja-sativa-l>)

Matičnjak (*Melissa officinalis* L.)



Matičnjak ili melisa je višegodišnja biljka visine od 70 cm do 150 cm. Listovi (slika 9) imaju miris na limun, a cvjetovi su sitni, nježne bijele boje te sadrže nektar, koji privlači pčele, pa otuda naziv biljke Melisa (grč. pčela). Preparati na bazi matičnjaka smiruju grčeve te reguliraju probavu, a listovi se mogu koristiti kao začim.

Slika 9. Listovi matičnjaka (Anonymous 9, <http://www.svijet-biljaka.hr/2015/sadnice/melisa>)

Preslica (*Equisetum arvense* L.)

Preslica (slika 10) je višegodišnja biljka s tankim i horizontalnim korijenom, a stabljika je uspravna s tankim i brojnim listovima u obliku kralježaka. Raste na močvarnom tlu i pjeskovitim područjima. Nezaobilazna je biljka u liječenju plućnih bolesti, posebice tuberkuloze (Bradley, 1992) te ima diuretička svojstva.

Slika 10. Preslica (Anonymous 10, <http://prirodnodozdravlja-ljekovitobilje.blogspot.hr/.html>)

2.2. Polifenolni spojevi kao bioaktivni sekundarni biljni metaboliti ljekovitih biljnih vrsta

Ljekovite biljne vrste su zbog svog bogatog bioaktivnog sastava predmet mnogobrojnih znanstvenih istraživanja kojima je cilj identificirati vrste i učinke njihovih aktivnih sastojaka. Tii aktivni sastojci najčešće su sekundarni metaboliti, tj. spojevi sintetizirani u biljkama, a sudjeluju u interakciji biljke s okolinom. Prema podacima iz 2000. godine, poznato je oko 139 000 sekundarnih biljnih metabolita, a svake godine otkriveno je 4000 novih struktura (Verpoorte, 2000). Najpoznatiji sekundarni metaboliti su polifenolni spojevi kojima su iznimno bogate ljekovite biljke.

Polifenolni spojevi zapravo su sekundarni biljni metaboliti široko rasprostranjeni u biljnome svijetu te je danas poznato već više od 8 000 različitih polifenolnih spojeva od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do složenijih struktura kao što su tanini. To su spojevi koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena na koje su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010). Osnovna podjela polifenola je na fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli, flavoni), tanine (kondenzirani i hidrolizirani) i ostale polifenolne spojeve kao što su kumarini i lignani (Naczki i Shahidi, 2006).

Popularnost polifenolnih spojeva posljednjih godina, kako za potrošače tako i istraživačku zajednicu, posljedica je njihovog iznimnog antioksidacijskog djelovanja zahvaljujući kojem pokazuju raznovrsne biološke učinke na ljudski organizam. Naime, iznimno je velik broj istraživanja o učinku biljnih polifenola u *in vitro* i *in vivo* sustavima kao antioksidansa, antimutagena te u prevenciji raka i bolesti kardiovaskularnih sustava (Pandey i

Rizvi, 2009). Njihova antioksidacijska svojstva postala su sve interesantnija prehrambenoj industriji zbog moguće primjene polifenolnih spojeva u zaštiti lako oksidirajućih sastojaka hrane te primjene polifenola u liječenju i prevenciji mnogih bolesti uzrokovanih neujednačenom ravnotežom oksidacijskih procesa u tijelu (Scalbert i sur., 2005; Robinson 2001). Međutim, kako bi se postigao unos što veće količine polifenola, a time i njihovo intenzivnije antioksidacijsko djelovanje u organizmu, takve polifenolne antioksidanse potrebno je ekstrahirati i proizvesti ekstrakte koji će omogućiti njihovu implementaciju u drugi prehrambeni proizvod.

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Ona je općenito prvi korak u izolaciji polifenolnih spojeva iz biljnih materijala. Ekstrakcije otapalima najčešće su korišteni postupci za pripremu ekstrakata iz biljnog materijala zbog svoje jednostavnosti korištenja, učinkovitosti i široke primjene (Dai i Mumper, 2010). Ekstrakcija polifenolnih spojeva zahtjevna je zbog njihove kemijske strukture i njihovih interakcija s drugim spojevima. Sastav i struktura (jednostavna i/ili složena) polifenolnih spojeva koji se izdvajaju određuju uvjete ekstrakcije. Najvažniji čimbenici koji utječu na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnih materijala su:

- otapalo
- temperatura
- vrijeme kontakta
- omjer otapala-otopljene tvari
- veličina čestica i
- pH (Takeuchi i sur., 2009).

Ekstrakcija polifenola zahtjevna je zbog dva glavna razloga. Prvo, ti spojevi su vrlo različiti s obzirom na svoju strukturu; oni se mogu pojaviti u biljnim tkivima u kombinaciji sa šećerima, proteinima ili mogu stvoriti polimerizirane derivate različite topljivosti. Njihove kemijske strukture i interakcije s drugim spojevima koji se mogu pronaći u hrani nisu u potpunosti poznati te je zato vrlo važan odabir dobrog otapala i uvjeta ekstrakcije. Drugo, polifenoli su osjetljivi na oksidaciju te visoke temperature i alkalna sredina mogu uzrokovati njihovu degradaciju zbog čega je potrebno s oprezom odrediti uvjete ekstrakcije (Družynska i sur., 2007).

2.3.1. Uvjeti ekstrakcije

Odvajanje topljivih polifenolnih spojeva iz biljaka može se provesti difuzijom čvrstog materijala (biljnog tkiva) koristeći otapalo. Svaki biljni materijal posjeduje jedinstvena svojstva koja mogu utjecati na ekstrakciju polifenolnih spojeva. Prema tome, važno je razviti optimalne metode ekstrakcije za kvantificiranje i identifikaciju polifenola (Takeuchi i sur., 2009). Postoji niz faktora i parametara koji imaju značajan utjecaj na učinak ekstrakcije. Potrebno ih je pažljivo optimizirati zbog osjetljivosti polifenola na toplinu, svjetlost, enzimsku i ne-enzimsku razgradnju. U nastavku je naveden sažetak utjecaja različitih parametara ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenola:

1. Otapalo

Pri odabiru otapala treba uzeti u obzir polarnost polifenola i samog otapala. Kao pravilo, obično je prihvaćeno da se slično otapa sa sličnim tako da se za polarna otapala smatra da su efikasnija u ekstrakciji polarnih tvari, a nepolarna otapala kod ekstrakcije nepolarnih tvari. Otapala kao što su metanol, etanol, aceton, etil acetat i njihove kombinacije koriste se za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala i često se miješaju s vodom u različitim omjerima. Odabirom pravog otapala utječe se na količinu i udjel ekstrahiranih polifenola (Dai i Mumper, 2010). Vodene smjese acetona dobra su otapala za polarne polifenole, ali njihova primjena može dovesti do neprihvatljivog udjela zaostalog acetona u ekstraktima (Dent i sur., 2013). Također pokazalo se da se polifenoli s većom molekularnom masom bolje ekstrahiraju s vodenom otopinom acetona, a za ekstrakciju polifenola manje molekulске mase bolji je metanol. Međutim, oba otapala nisu našla veliku primjenu u prehrambenoj industriji zbog lošeg utjecaja na ljudsko zdravlje. Voda i etanol najčešće se koriste zbog svoje niske toksičnosti i visokog učinka ekstrakcije, s mogućnošću podešavanja polarnosti otapala miješanjem etanola i vode u različitim omjerima.

2. Vrijeme i temperatura ekstrakcije

Ovi parametri su također važni su za ekstrakciju te se moraju optimizirati jer efikasnost procesa uvelike ovisi upravo o temperaturi i vremenu. Povišene temperature ekstrakcije poboljšavaju učinkovitost procesa povećanjem topljivosti otopine i koeficijenta difuzije. Međutim, kod polifenolnih spojeva treba obratiti pozornost na njihovu stabilnost tijekom procesa jer polifenolni spojevi, kod dugotrajnih ekstrakcija i visokih temperatura, lako hidroliziraju i dolazi do njihove toplinske razgradnje (oksidacije) te gubitka aktivnosti što rezultira smanjenim udjelom polifenola u ekstraktima. Na primjer, kod konvencionalnih

ekstrakcija antocijanina, ekstrakcije se obično provode na temperaturama u rasponu od 20 do 50°C jer je pri temperaturama većim od 70 °C pokazano da uzrokuju brzu razgradnju antocijanina (Dai i Mumper, 2010).

3. Veličina čestica

Na udjel polifenola ekstrahiranog iz biljnog materijala bitno utječe i različita veličina čestica uzorka. Prijenos tvari iz biljaka može se poboljšati korištenjem manjih čestica radi poboljšanja prodiranja otapala u biljni materijal te povećanja brzine ekstrakcije polifenola i učinka ekstrakcije. Međutim, veličina čestica mora biti ograničena jer zbog izuzetno malih čestica, koje obično imaju tendenciju spojiti se u aglomerate, dolazi do smanjenja prodiranja otapala u biljni materijal, što negativno utječe na postupak prijenosa tvari (Takeuchi i sur., 2009).

4. pH ekstrakcije

Za polifenole većina ekstrakcija izvode se u kiselim uvjetima, jer su općenito stabilniji u nižem pH području, a kiseli uvjeti pomažu polifenolima da ostanu neutralni te se tako lakše ekstrahiraju organskim otapalima.

2.3.2. Primjena vode kao otapala za ekstrakciju polifenola

Voda je univerzalno otapalo koje se koristi za izdvajanje biljnih metabolita iz ljekovitih biljnih vrsta. U tradicionalnim sustavima narodne medicine prvenstveno se koristila voda kao otapalo kako bi se izdvojili polifenoli topivi u vodi koji su važni kao antioksidansi. Iako je voda dobro otapalo za polifenole, učinak ekstrakcije vodenim otapalom je manji nego primjenom organskih otapala, dijelom zato što su polifenoli prisutni u biljnim tkivima često vezani za proteine i polisaharide vodikovim vezama i hidrofobnim vezama. Stoga dobro otapalo za ekstrakciju mora ne samo imati dobru moć otapanja, već također imati sposobnost cijepanja vodikovih veza. To je ujedno i razlog zašto se za ekstrakciju, kao otapala, obično koriste mješavine vode i organskih otapala (Miralai i sur., 2008). Osim vode, kao otapala u prehrambenoj industriji koriste se organska otapala i tekući plinovi. Ako se ekstrakti ljekovitih biljaka koriste za ljudsku upotrebu, primjena otapala za ekstrakciju propisana je posebnim zakonskim propisima. Prema Europskoj uniji dopuštena su sljedeća otapala:

- voda (s primjesom kiselina ili baza)
- prehrambeni proizvodi sa svojstvima otapala

- otapala kao što su propan, butan, etil acetat, etanol, aceton.

Pri korištenju vode i drugih prehrambenih proizvoda sa svojstvima otapala, pretpostavlja se da njihov zaostatak u ekstraktu nije štetan za ljude. Nasuprot tome, kod primjene industrijskih otapala definirani su maksimalni udjeli otapala koji smiju zaostati u ekstraktu (Bart, 2011).

U tablici 1 dan je pregled uvjeta ekstrakcije polifenola iz pojedinih biljnih vrsta korištenjem različitih ekstrakcijskih tehnika.

Tablica 1. Pregled udjela polifenola u ljekovitim biljnim vrstama prema navedenim uvjetima ekstrakcije

Biljna vrsta	Tehnika ekstrakcije	Uvjeti ekstrakcije	Udjel polifenola	Referenca
Gospina trava	Čvrsto-tekuće ekstrakcija	T=70 °C, t=95min, otapalo= 10%-tna vodena otopina glicerola	TPC=89.9 mg GAE/g suhe tvari	Karakashov i sur., 2015
Kadulja	Čvrsto-tekuće ekstrakcija	T=60 °C, t= 30 min, otapalo= 30%-tna vodena otopina etanola	TPC= 6278.12 mg/100 g suhe tvari	Dent i sur., 2013
Lavanda	Čvrsto-tekuće ekstrakcija	T= sobna temperatura, t= 10h, otapalo= 10%-tna mješavina otapala acetata, destilirane vode i etilnog alkohola	TPC= 50.6 +3.1 mg GAE/g suhe tvari	Spiridon i sur., 2011
Lipa	/	T= 90 °C, t=15 min, otapalo= voda	787 ± 43 mg GAE/ 100 g suhe tvari	Kratchanova i sur., 2010
Majčina dušica	Ultrazvučna ekstrakcija	t= 3 min. otapalo= 30%-tna vodena otopina etanola, veličina čestica=0.3mm,	TPC=23.03 mg/L	Jovanović i sur., 2016
Maslina	Ultrazvučna ekstrakcija	t= 60 min, otapalo= 50%-tna vodena otopina etanola	TPC= 25.0626 mg GAE/g suhog lišća	Sahin i Samli, 2013

Matičnjak	Čvrsto-tekuće ekstrakcija	T= sobna temperatura, t= 10 h, otapalo= 10%-tna mješavina otapala acetata, destilirane vode i etilnog alkohola	TPC= 54.9 + 2.14 mg GAE/g suhe tvari	Spiridon i sur., 2011
Menta	/	T= sobna temperatura, t= 24 h, otapalo= 50%-tna vodena otopina etanola	TPC= 39.47 ± 1.81 mg GAE/g suhe tvari	Brahmi i sur., 2012
Neven	/	T= 90 °C, t=15 min, otapalo= voda	TPC= 1537 ± 33 mg GAE/100 g suhe tvari	Kratchanova i sur.,2010
Preslica	Mikrovalna ekstrakcija	t= 80 s, otapalo=54.5% -tna vodena otopina etanola, snaga mikrovalova= 170 W	TPC= 161.57 mg GAE/ g suhe tvari	Milutinović i sur., 2014

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

U ovom radu kao ljekovite biljne vrste za ispitivanje učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva korištene su sljedeće biljne vrste: maslina (*Olea europaea* L.), lipa (*Tilia* L.), gospina trava (*Hypericum perforatum* L.), neven (*Calendula officinalis* L.) i preslica (*Equisetum* L.). Cvjetovi gospine trave, nevena i lipe, listovi masline i stabljika preslice kupljeni su u osušenom obliku od proizvođača ljekovitih biljnih čajeva (Suban d.o.o.) usitnjeni su pomoću mlinca za domaćinstvo te prosijani kroz granulometrijska sita različitih veličina perforacija kako bi se dobile frakcije određene veličine čestica (prikazane u tablici 2).

3.1.1. Priprema ekstrakata

U svrhu ekstrakcije polifenolnih spojeva iz ispitivanih biljnih vrsta, provedena je ekstrakcija vodom kao otapalom i to kombinacijom temperature ($T/^{\circ}\text{C}$), vremena ekstrakcije (t/min), brzine miješanja (rpm) i veličine čestica biljnog materijala (μm), kao parametara ekstrakcije. Primjenom računalnog programa *Design Experiment*, dobiveno je 9 kombinacija ekstrakcijskih parametara prema kojima je provedena ekstrakcija, kako je prikazano u tablici 2. Svi postupci ekstrakcije provedeni su u uljnoj kupelji (Ika.), na magnetskoj miješalici s mogućnosti podešavanja temperature i brzine rotacije (miješanja). Nakon ekstrakcije, dobiveni ekstrakti profiltrirani su kroz filter papir te odmah analizirani.

Tablica 2. Prikaz parametara ekstrakcije

	$T/^{\circ}\text{C}$	veličina čestica/ μm	t/min	rpm
Exp 1	40	<100	30	250
Exp 2	40	280-450	60	500
Exp 3	40	3000-4000	90	750
Exp 4	60	<100	30	750
Exp 5	60	280-450	60	250
Exp 6	60	3000-4000	90	500
Exp 7	80	<100	30	500
Exp 8	80	280-450	60	750
Exp 9	80	3000-4000	90	250

3.2. Metode

U svrhu određivanja ekstrakcijske učinkovitosti polifenola, svim pripremljenim ekstraktima određen je prinos ekstrakcije temeljen na određivanju suhe tvari ekstrakata, udjel ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet pomoću tri različite metode i to: ABTS, DPPH i FRAP metoda.

3.2.1. *Određivanje prinosa ekstrakcije*

Princip metode:

Prinos ekstrakcije određen je kao udjel suhe tvari ekstrakta primjenom standardne metode sušenja na 105°C. Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda, koji ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na 105°C do konstantne mase.

Postupak rada:

U osušenu i izvaganu metalnu posudicu s poklopcem stavi se kvarcni pijesak u količini dovoljnoj da prekrije dno posudice i stakleni štapić. Posudica se suši u sušioniku sa skinutim poklopcem na 105°C. Nakon sušenja sat vremena od trenutka kada je postignuta ta temperatura, poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu s točnošću $\pm 0,0002$.

U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom i staklenim štapićem, odvagane se 3 g uzorka ($\pm 0,0001$).

Sušenje uzorka traje 4 sata pri 105°C u zračnoj sušnici s automatskim temperaturnim regulatorom. Posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi. Nakon toga posudice se važu na analitičkoj vagi.

Aparatura i pribor:

- 1) Analitička vaga, Kern ABT 220-4M
- 2) Aluminijska posuda (promjera oko 5 cm i visine 3 cm)
- 3) Laboratorijski sušionik
- 4) Eksikator sa sredstvom za sušenje
- 5) Stakleni štapić

Izračunavanje:

Udjel vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli:

$$\% \text{ vode} = (a-b) \cdot 100 / m$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode}$$

gdje je:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom poslije sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

Na istom uzorku moraju se obaviti najmanje 2 određivanja, koja se ne smiju razlikovati više od 0,2% obzirom na udjel vode odnosno udjel suhe tvari.

3.2.2 Folin-Ciocalteu metoda određivanja ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdenove i fosfomolibden kiseline, koja reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksidion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije u kojoj svi polifenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Očitanje apsorbancije proporcionalno je intenzitetu proizašle plave boje i koncentraciji antioksidansa.

Reagensi:

- 1) Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen vodom u omjeru 1:2), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 20%-tna otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 3) Otopina galne kiseline koncentracija 0-500 mg/L (za konstruiranje baždarne krivulje), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

- 1) odmjerne tikvice, volumena (10-1000 mL)
- 2) mikropipeta, volumena (100-1000 μL)
- 3) pipete, volumena 5 mL i 10 mL

- 4) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) spektrofotometar. Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

U staklenu epruvetu otpipetira se 50 μL uzorka, 3,95 mL destilirane vode te 250 μL Folin-Ciocalteu reagensa, promiješa i doda 750 μL 20%-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Sadržaj tikvice se zatim ponovno dobro promiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 50 μL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te tako dobivenu vrijednost koristiti za izračunavanje konačnog rezultata. Svaki uzorak priprema se u dvije paralelne probe ($n=2$), i dobiveni rezultati preračunaju u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L pomoću jednadžbe pravca:

$$y = 0,001x + 0,001$$

gdje su:

x- koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)

y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a u ovom radu koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Stoga se udjel ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi izražava kao funkcija koncentracije i vremena, i mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-

hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima.

Reagensi:

- 1) etanol (96 %tni) , Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 140 mM otopina kalijevog peroksodisulfata ($K_2S_2O_8$), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 3) 7 mM otopina 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS)

Aparatura i pribor:

- 1) odmjerne tikvice, volumena (10-100 mL)
- 2) pipete, volumena (0-10 mL)
- 3) mikropipeta, volumena (0-100 μ L)
- 4) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka pripremi se otopina ABTS+ radikala, oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 μ L 140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata te nadopuniti sa 7 mM otopinom ABTS reagensa do volumena od 5 mL. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5 neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (min. 12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS+ radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$.

Alikvot od 40 μ L uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS+ radikala u kiveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minute. Prije mjerenja uzoraka, potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka 40 μ L vode pomiješa s istom količinom reagensa (4 mL otopine ABTS+ radikala).

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema baždarnom pravcu preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa):

$$y=0,303x+0,0006$$

gdje su:

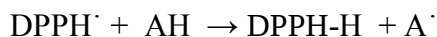
x- koncentracija standarda otopine Troloxa (mmol/L)

y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidativne aktivnosti temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Blois, 1958; Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995).



Reagensi:

- 1) metanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH)

Aparatura i pribor:

- 1) odmjerne tikvice, volumena (10-100 mL)
- 2) pipete, volumena (1-10 mL)
- 3) mikropipeta, volumena (100-1000 μL)
- 4) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100 μL ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Po dodatku otopine DPPH pripremljeni uzorci ostavljaju se na stajanje u trajanju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi te mjeri se apsorbancija pri 515 nm . U drugu

epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μ L metanola te 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH.

Vrijednost ΔA za nepoznati uzorak dobiva se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe. Rezultati ΔA preračunavaju se prema baždarnoj krivulji u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta - analog vitamina E).

$$y = 0,603x - 0,0068$$

gdje su:

x- koncentracija standarda otopine Troloxa (mmol/L)

y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip metode:

Ova metoda temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriiazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 593 nm.

Reagensi:

- 1) 40 mM otopina kloridne kiseline, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) natrijev acetat-trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 3) koncentrirana octena kiselina), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 4) 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ)
- 5) 20 mM otopina željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
- 6) željezo(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)

Aparatura i pribor:

- 1) odmjerne tikvice, volumena 25 mL, 100 mL, 200 mL i 500mL
- 2) pipeta, volumena 10 mL
- 3) mikropipete, volumena 0-100 μ L i 1000 μ L
- 4) kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 5) spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Postupak rada:

Za pripremu 500 mL acetatnog pufera koncentracije 300 mM potrebno je otopiti 1,55 g natrijevog acetata $\times 3\text{H}_2\text{O}$ u vodi i dodati 8 mL koncentrirane octene kiseline. Osim toga je potrebno pripremiti 10 mM otopinu 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) otapanjem u 40 mM otopini kloridne kiseline, i 20 mM vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$).

FRAP reagens priprema se miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ-a i 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, tako da omjer dodanih otopina bude 10 :1 :1.

Za provođenje mjerenja u epruveti se pomiješa 200 μL uzorka i 3,8 mL FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka 200 μL vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa (3,8 mL). Za izračunavanje koncentracije (u mM željezo(II)-sulfat-heptahidrata) prema baždarnom pravcu, potrebno je oduzeti apsorbanciju slijepe probe od apsorbancije uzorka te tako dobivenu razliku apsorbancija koristiti za preračunavanje.

$$y = 1,1332 x + 0,0033$$

gdje su:

x- koncentracija standarda otopine željezo(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (mmol/L)

y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm

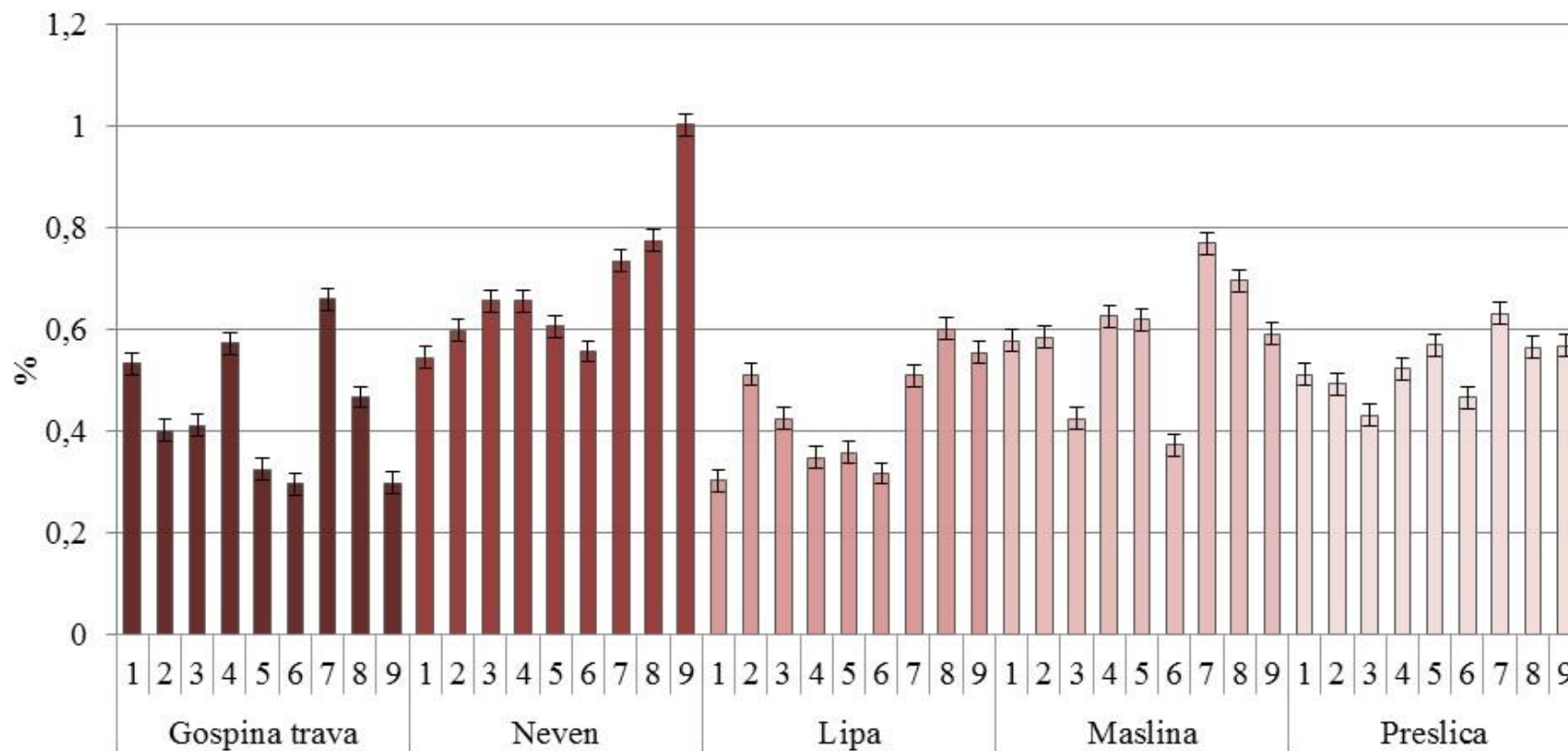
3.2.6. Statistička obrada podataka

Kako bi velik broj rezultata, dobiven analizom 5 različitih biljnih vrsta te 9 različitih ekstrakcijskih eksperimenata, na jednostavniji način prikazao odnos između prinosa pojedinog ekstrakcijskog eksperimenta, udjela polifenolnih spojeva te antioksidacijskog kapaciteta dobivenih ekstrakata provedena je multivarijantna statistička analiza- metoda analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*- PCA). Ova metoda temelji se na određivanju korelacija između pojedinih varijabli pri čemu grupira uzorke u glavne komponente (engl. *principal components PCs*) i opisuje odnos između pojedinih varijabli te omogućuje vizualizaciju njihovog odnosa, tj. da li su one slične ili različite. Objekti koji su slični jedan drugome grupirat će se zajedno, dok će oni različiti biti udaljeniji. PCA je primijenjena na cjelokupni set podatka dobiven nakon ekstrakcije svih biljnih vrsta, pri čemu su za provođenje analize glavnih komponenti, kao zavisne varijable korišteni parametri prinosa ekstrakcije, udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog pomoću sve tri metode (ABTS, DPPH i FRAP).

4. REZULTATI

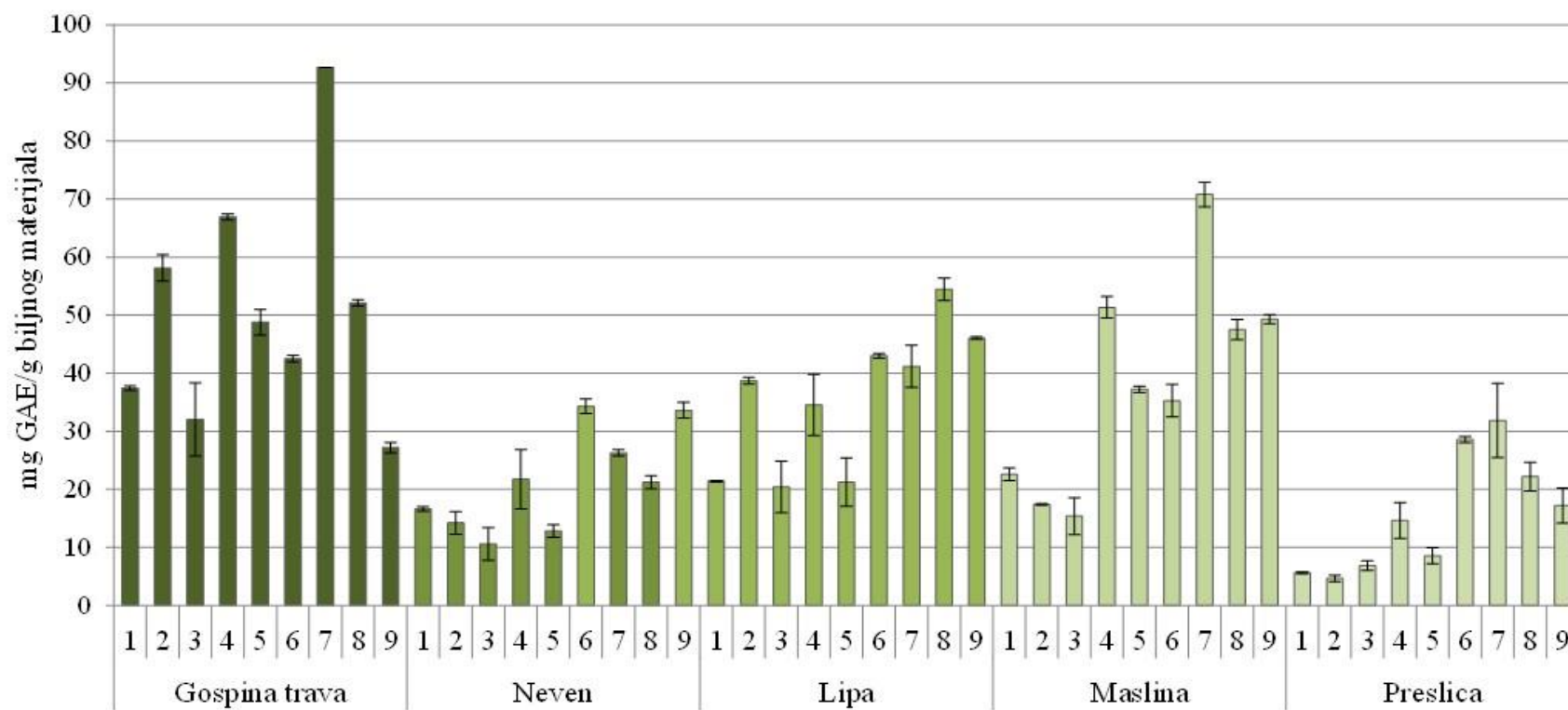
U ovom radu ispitan je utjecaj različitih parametara ekstrakcije polifenolnih antioksidansa iz 5 ljekovitih biljnih vrsta, primjenom vode kao otapala za ekstrakciju i variranjem različitih parametara ekstrakcije i to: temperature, brzine miješanja, vremena (trajanja) ekstrakcije i veličine čestica biljnog materijala. Na slici 11 prikazani su rezultati prinosa ekstrakcija iz 9 različitih kombinacija ekstrakcijskih parametara za svaku biljnu vrstu. Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola, dobiveni primjenom Folin-Ciocalteu metode, prikazani su na slici 12. Antioksidacijski kapaciteti svih dobivenih ekstrakata, određeni ABTS, DPPH i FRAP metodama, prikazani su na slikama 13-15. Tablica 3 prikazuje korelacijske koeficijente između prethodno navedenih metoda, odnosno izlaznih parametara ekstrakcije ispitivanih biljnih vrsta. U tablici 4 prikazani su rezultati analize glavnih komponenti sa svojstvenim vrijednostima i iznosima varijanci za prvih 5 glavnih komponenti.

4.1. Prinos ekstrakcijskih eksperimenata biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije



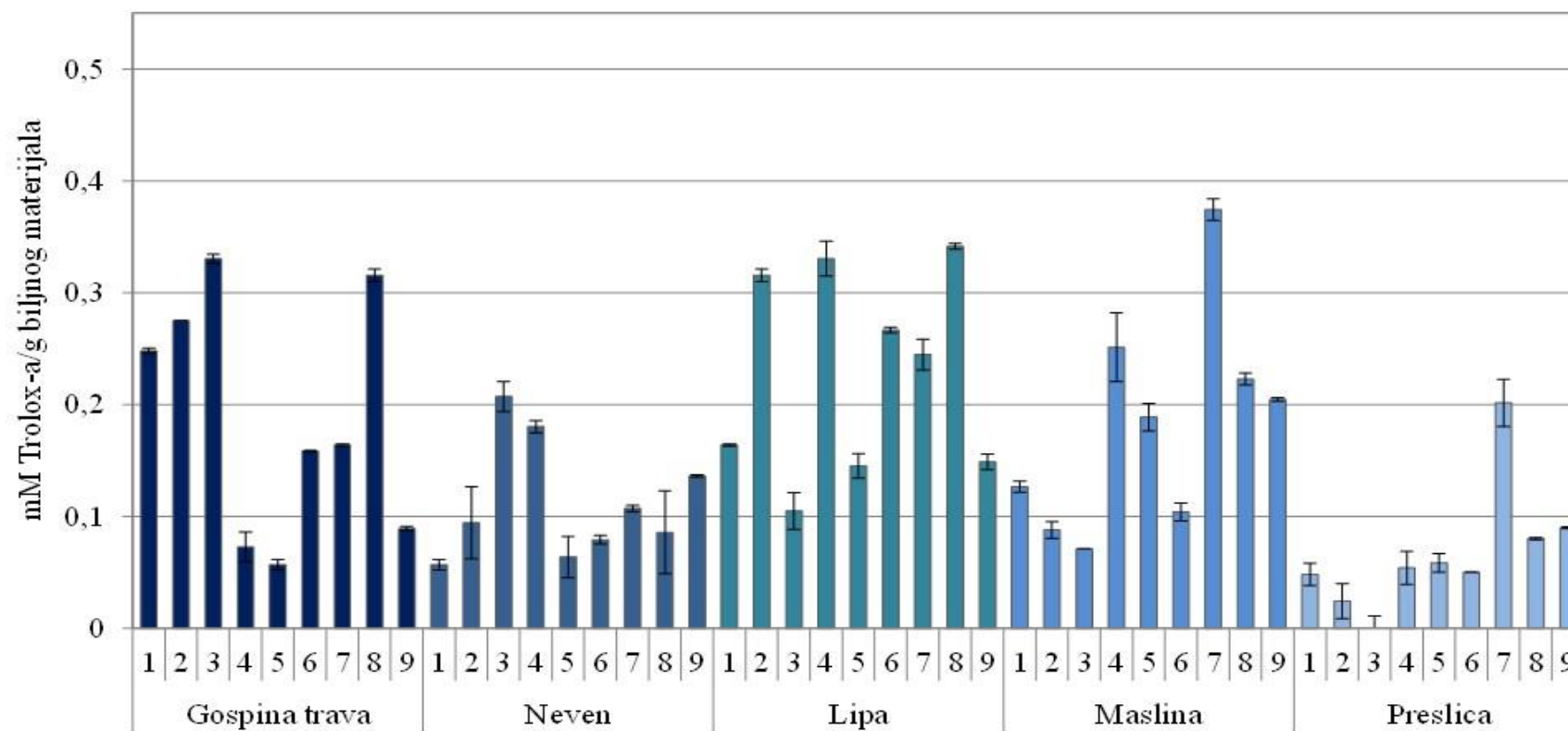
Slika 11. Prikaz prinosa ekstrakcije (%) u vodenim ekstraktima biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije

4.2. Udjel ukupnih polifenola u biljnim ekstraktima



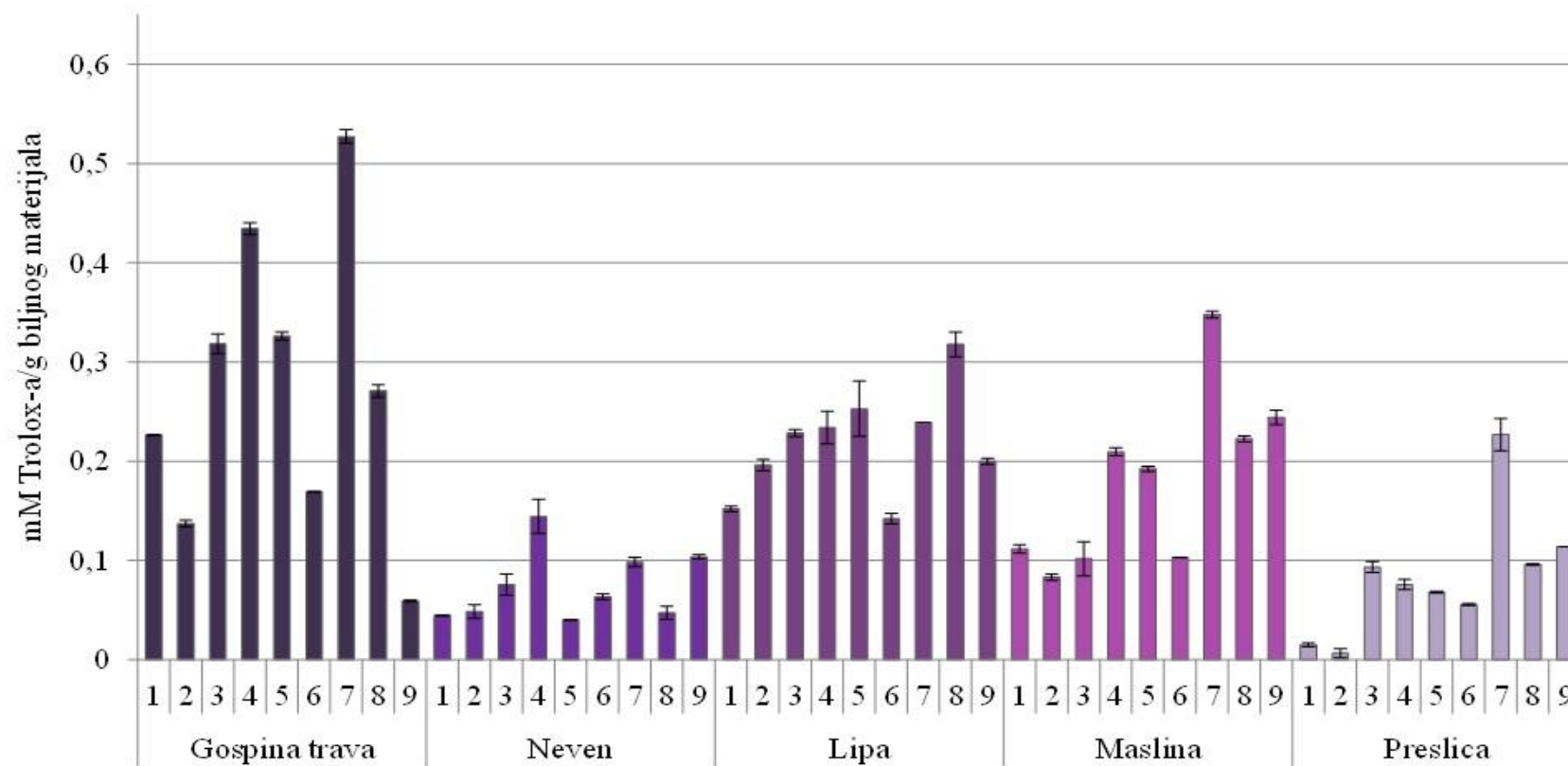
Slika 12. Udjel ukupnih polifenola (mg GAE/g biljnog materijala) u vodenim ekstraktima biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije

4.3. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom



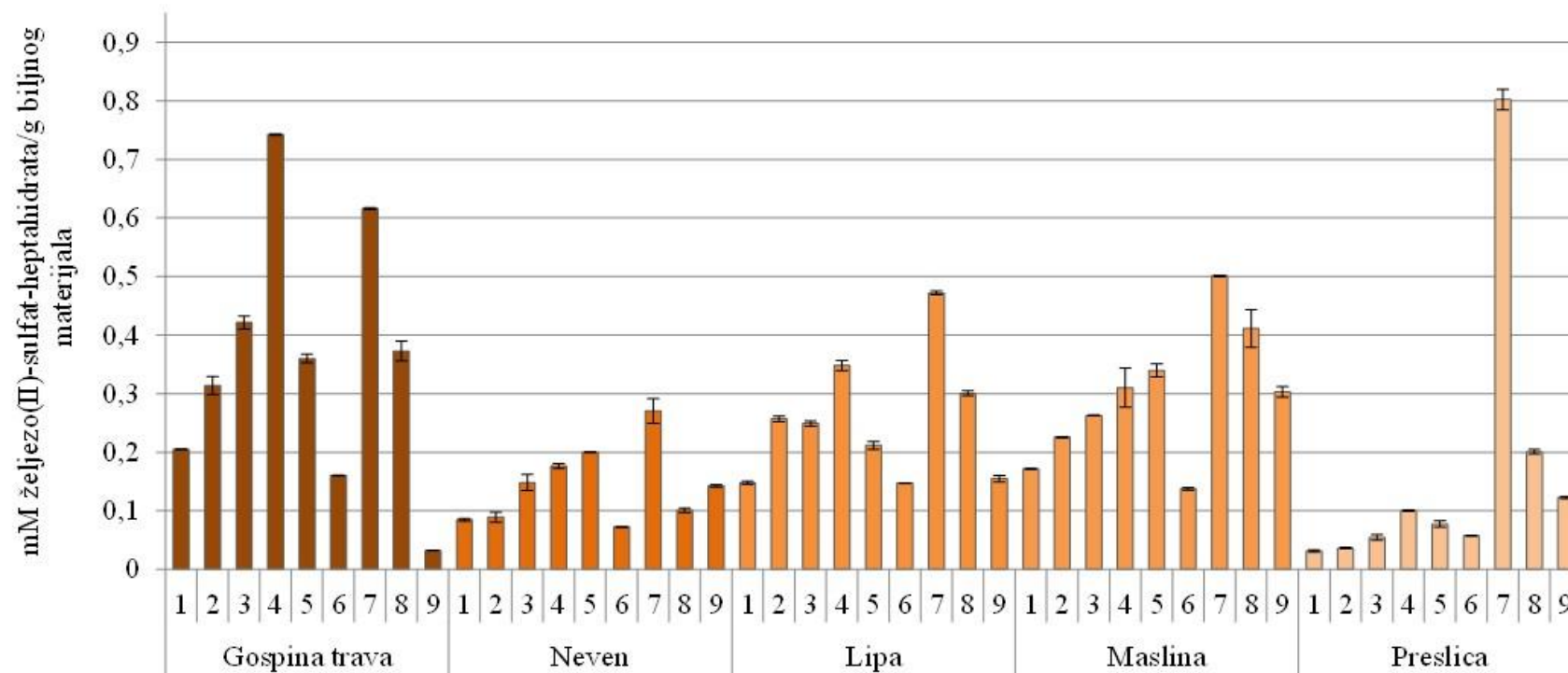
Slika 13. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom (mM Troloxa/g biljnog materijala) u vodenim ekstraktima biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije

4.4. Antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom



Slika 14. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom (mM Troloxa/g biljnog materijala) u vodenim ekstraktima biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije

4.5. Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom



Slika 15. Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom (mM željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala) u vodenim ekstraktima biljnih vrsta pri različitim uvjetima ekstrakcije

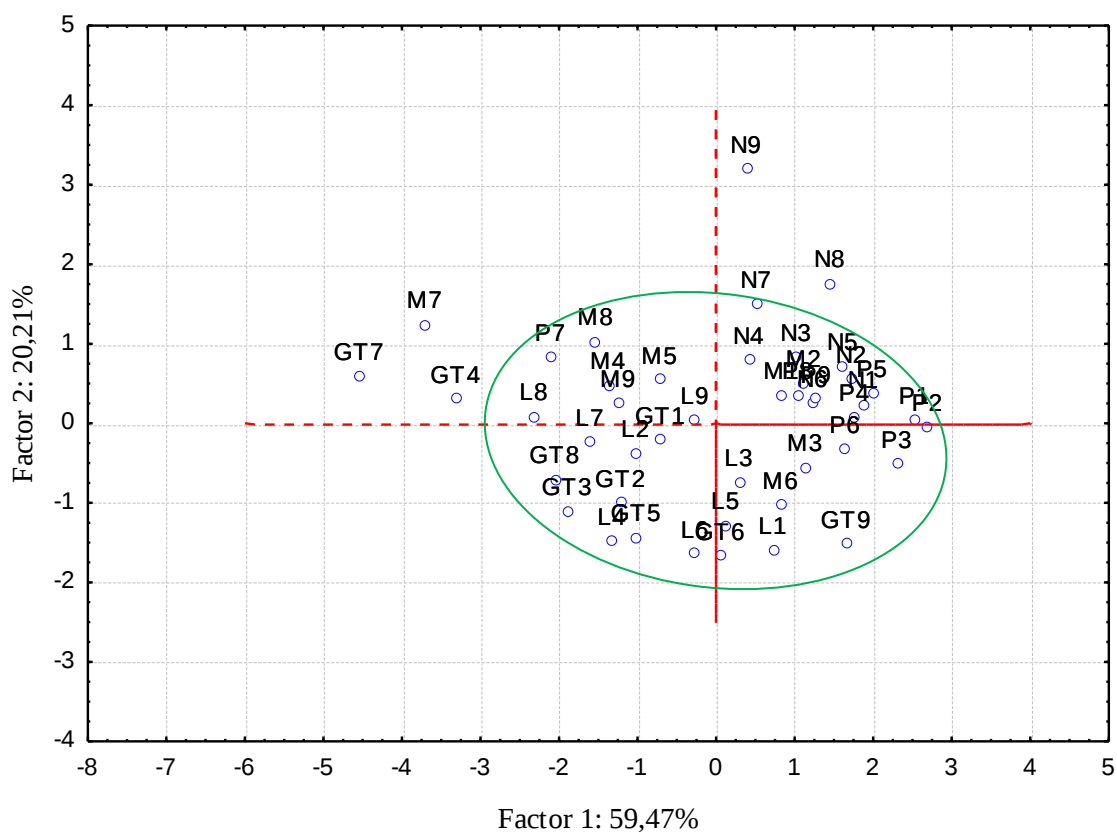
4.6. Statistička analiza podataka – korelacijski koeficijenti i analiza glavnih komponenti

Tablica 3. Korelacijski koeficijenti između izlaznih parametara ekstrakcije ispitivanih biljnih vrsta

	Prinos ekstrakcije	Uk. polifenoli	ABTS	DPPPH	FRAP
Prinos ekstrakcije	1,000	0,101	0,031	0,000	0,167
Uk. polifenoli	0,101	1,000	0,568	0,825	0,674
ABTS	0,031	0,568	1,000	0,540	0,468
DPPH	0,000	0,825	0,540	1,000	0,807
FRAP	0,167	0,674	0,468	0,807	1,000

Tablica 4. Rezultati analize glavnih komponenti sa svojstvenim vrijednostima i iznosima varijanci za prvih 5 glavnih komponenti (faktora)

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5
Svojstvene vrijednosti	2,9734	1,0104	0,5872	0,3093	0,1196
% Ukupne varijance	59,4686	20,20947	11,7429	6,1862	2,3928
<i>Prinos ekstrakcije</i>	-0,13094	0,98673	0,07763	-0,03503	0,04438
<i>Udjel ukupnih polifenola</i>	-0,90086	-0,02012	-0,05832	-0,4006	-0,15547
<i>ABTS</i>	-0,72235	-0,11385	0,67293	0,11109	0,00800
<i>DPPH</i>	-0,93025	-0,12007	-0,21355	-0,03587	0,27078
<i>FRAP</i>	-0,87039	0,09518	-0,28156	0,36603	-0,14181



Slika 16. Grafički prikaz odnosa faktora 1 (PCA1) i faktora 2 (PCA2) za ispitivane biljne ekstrakte s obzirom na udjel određivanih bioaktivnih parametara kao pokazatelja ekstrakcijske učinkovitosti

5. RASPRAVA

5.1. Prinos ekstrakcije

Slika 11 prikazuje postignute prinose (%) ekstrakcija vodenih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta. Prema prikazanim rezultatima najveći prinos određen je u ekstraktima nevena (1,00%), nakon čega slijede ekstrakti masline (0,77%), gospine trave (0,66%), preslice (0,63%) te lipe (0,61%) s najmanjim prinosima. Usporedbom dobivenih vrijednosti ekstrakcijskih prinosa za sve biljne vrste, primijećeno je da su najveći prinosi određeni kombinacijom parametara ekstrakcije 7, 8 i 9, koji su se od drugih eksperimenata razlikovali po najvišoj temperaturi ekstrakcije (80°C). Takav rezultat upućuje na činjenicu da je temperatura najvažniji parametar vodene ekstrakcije biljnih polifenola konvencionalnim postupkom pripreme infuzija (miješanjem), što je u skladu s prethodnim rezultatima istraživanja Komes i suradnika (2011). Na osnovu dobivenih rezultata, za većinu biljnih ekstrakata primijećena je podudarnost između ekstrakata s najvećim prinosom ekstrakcije i udjelom ukupnih polifenola i to u slučaju kombinacije parametara ekstrakcije 7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 30\text{ min}$, veličina čestica $= < 100\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja $= 500\text{ rpm}$) i parametara ekstrakcije 8 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60\text{ min}$, veličina čestice $= 280\text{--}450\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja $= 750\text{ rpm}$).

5.2. Utjecaj uvjeta ekstrakcije na udjel ukupnih polifenola

Slika 12 prikazuje udjel ukupnih polifenola (mg GAE/g biljnog materijala) u biljnim ekstraktima pri različitim uvjetima ekstrakcije. Najveći udjel ukupnih polifenola određen je u ekstraktu gospine trave ($92,70 \pm 0,00\text{ mg GAE/g biljnog materijala}$), zatim masline ($70,80 \pm 2,13\text{ mg GAE/g biljnog materijala}$), lipe ($54,48 \pm 1,94\text{ mg GAE/g biljnog materijala}$) te u ekstraktu nevena ($34,32 \pm 1,26\text{ mg GAE/g biljnog materijala}$), dok je najmanji udjel ukupnih polifenola utvrđen kod ekstrakta preslice ($31,89 \pm 6,39\text{ mg GAE/g biljnog materijala}$). U istraživanju Kratchanove i suradnika (2010) određivan je udjel ukupnih polifenola 25 različitih ljekovitih biljnih vrsta čiji se raspon kretao od 776 do 9356 mg GAE/100 g suhe tvari te se može zaključiti da se vrijednosti izmjerene u ovom radu podudaraju s dobivenim rezultatima navedenog istraživanja. Međutim, u navedenom istraživanju iste biljne vrste: gospina trava ($6428\text{ mg GAE/100 g suhe tvari}$), neven ($1537\text{ mg GAE/100 g suhe tvari}$) i lipa ($787\text{ mg GAE/100 g suhe tvari}$) imale su puno manje vrijednosti udjela ukupnih polifenola od vrijednosti dobivenih u ovome radu, što se može objasniti korištenjem drugačijih parametara

ekstrakcije ($T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 15\text{ min.}$, brzina miješanja = $6\,000 \times g$) te geografskog porijekla biljnih vrsta.

Najveći udjeli ukupnih polifenola, za većinu biljnih ekstrakata, određen je primjenom ekstrakcije broj 7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 30\text{ min.}$, veličina čestica = $< 100\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 500 rpm). U slučaju ekstrakata nevena i lipe najveći udjeli ukupnih polifenola zabilježeni su korištenjem kombinacije parametra ekstrakcije 6 ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 90\text{ min.}$, veličina čestice = $3000\text{--}4000\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 500 rpm), a za uzorak lipe kombinacije parametara ekstrakcije 8 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60\text{ min.}$, veličina čestice = $280\text{--}450\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 750 rpm). Prema navedenim rezultatima može se zaključiti da je pri temperaturi 80°C postignuta najveća ekstrakcijska učinkovitost ukupnih polifenola, što može biti posljedica povećane brzine difuzije te prelaska polifenolnih spojeva u vodeni medij. S obzirom na brzinu miješanja, brzina miješanja od 500 rpm rezultirala je najvećim udjelom ukupnih polifenola. Veličina čestica biljnog materijala ima značajan utjecaj na udjel ukupnih polifenola jer manje čestice s većom aktivnom površinom omogućavaju bolji kontakt s otapalom, te je stoga pri veličinama čestica manjim od $100\text{ }\mu\text{m}$, te veličini čestica od $280\text{ do }450\text{ }\mu\text{m}$ za ekstrakt lipe, utvrđen veći udjel ukupnih polifenola. Međutim, kod biljnog ekstrakta nevena se pokazalo da veća veličina čestica ($3000\text{--}4000\text{ }\mu\text{m}$) utječe na veći udjel ukupnih polifenola. Prema nedavnom istraživanju utvrdilo se da je veličina čestica od $3\text{--}5\text{ mm}$ ($3000\text{--}5000\text{ }\mu\text{m}$) optimalan parametar za ekstrakciju polifenola nevena (Iudina, 2015).

Najmanji udjel ukupnih polifenola, za većinu biljnih ekstrakata, zabilježen je kod parametra ekstrakcije 3 ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 90\text{ min.}$, veličina čestica = $3000\text{--}4000\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 750 rpm) te parametara ekstrakcije 2 ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60\text{ min.}$, veličina čestica = $280\text{--}450\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 500 rpm). Naime, primjena nižih temperatura utječe na smanjenu brzinu difuzije, dulje trajanje ekstrakcije može rezultirati degradacijom polifenola, dok veća veličina čestica rezultira manjom aktivnom površinom kontakta između čestica i otapala. Prema tome kombinacija parametara ekstrakcije 2 i 3 rezultira najmanjim udjelima ukupnih polifenola.

5.3. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen ABTS metodom

Slika 13 prikazuje antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen ABTS metodom (mmol Trolox-a/g biljnog materijala). Najveći antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod ekstrakta masline ($0,374 \pm 0,0097\text{ mmol Troloxa/g biljnog materijala}$), zatim lipe ($0,245 \pm 0,0137\text{ mmol Trolox-a/g biljnog materijala}$), gospine trave ($0,150 \pm 0,0118\text{ mmol Trolox-a/g biljnog materijala}$) te nevena ($0,207 \pm 0,1342\text{ mmol Trolox-a/g biljnog materijala}$),

a najmanji antioksidacijski kapacitet izmjeren je kod ekstrakta preslice ($0,201 \pm 0,0211$ mmol Trolox-a/g biljnog materijala). Prema rezultatima Mantle-a i suradnika (2000), koji su ABTS metodom određivali antioksidacijski kapacitet 39 različitih ljekovitih biljnih vrsta, dobivene vrijednosti kretale su se od 0,01 do 2,22 mmol Trolox-a/g biljnog materijala, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

Najveći antioksidacijski kapaciteti, za biljne ekstrakte masline i preslice, utvrđeni su kod parametra ekstrakcije 7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ min, veličina čestica = $< 100\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 500 rpm). Za biljne ekstrakte nevena i gospine trave najveći antioksidacijski kapacitet određen je kod parametra ekstrakcije 3 ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 90$ min, veličina čestica = 3000-4000 μm i brzini miješanja = 750 rpm), a za uzorak lipe kod parametra ekstrakcije 8 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ min, veličina čestice = 280-450 μm i brzina miješanja = 750 rpm). Prema grafičkom prikazu udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta, primjećuje se podudarnost (najveći udjeli) dobivenih rezultata i to kod parametra ekstrakcije 7 za ekstrakte masline i preslice, zatim kod parametra ekstrakcije 8 za uzorak lipe, no, u slučaju ekstrakata nevena i gospine trave primijećena su odstupanja. Takva nedosljednost između relativno visokog antioksidacijskog djelovanja i niskog udjela polifenola zabilježena je u radu Kiselove i suradnika (2006) za ekstrakte crnog čaja i smilja. Njihovi rezultati pokazali su da drugi bioaktivni spojevi osim polifenola mogu doprinijeti antioksidacijskom djelovanju ovih biljnih vrsta. Budući da kod biljaka antioksidacijski kapacitet nije ograničen samo na sadržaj polifenola, nego i na druge spojeve topljive u vodi koji mogu pridonijeti antioksidacijskom djelovanju biljnih ekstrakata, moguće je da su za antioksidacijski kapacitet gospine trave i nevena odgovorni drugi bioaktivni spojevi ovih biljnih vrsta.

5.4. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen DPPH metodom

Slika 14 prikazuje antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen DPPH metodom (mmol Trolox-a/g biljnog materijala). Najveći izmjereni antioksidacijski kapacitet određen je kod ekstrakta gospine trave ($0,527 \pm 0,0068$ mmol Trolox-a/g biljnog materijala), zatim kod ekstrakta masline ($0,348 \pm 0,0035$ mmol Trolox-a/g biljnog materijala) te ekstrakta lipe ($0,318 \pm 0,0124$ mmol Trolox-a/g biljnog materijala) i preslice ($0,227 \pm 0,0161$ mmol Trolox-a/g biljnog materijala). Najmanji antioksidacijski kapacitet utvrđen je kod ekstrakta nevena ($0,144 \pm 0,0172$ mmol Trolox-a/g biljnog materijala).

Za većinu biljnih ekstrakata poredak prema vrijednostima antioksidacijskih kapaciteta podudara se s poretkom prema udjelu ukupnih polifenola, posebice za ekstrakte dobivene

primjenom parametara ekstrakcije 7 i 8. Osim toga, usporedbom rezultata antioksidacijskih kapaciteta određenih primjenom ABTS i DPPH metoda, za većinu biljnih ekstrakata primijećena je podudarnost što rezultira visokom korelacijom između navedenih metoda. Uočene razlike dobivene u rezultatima antioksidacijskog kapaciteta posljedica su različitosti u primijenjenim metodama budući se za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koriste različiti slobodni radikali te dolazi do drugačijih reakcija između slobodnih radikala i antioksidansa u uzorcima, što ovisi o strukturi odnosno vrsti polifenola (Singleton i Rossi, 1965).

5.5. Antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata određen FRAP metodom

Slika 15 prikazuje dobivene antioksidacijske kapacitete određene FRAP metodom (mmol željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala). Najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je kod ekstrakta preslice ($0,80 \pm 0,018$ mmol željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala), zatim kod ekstrakta gospine trave ($0,74 \pm 0,001$ mmol željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala), masline ($0,50 \pm 0,001$ mmol željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala) i ekstrakta lipe ($0,47 \pm 0,003$ mmol željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala), a najmanji antioksidacijski kapacitet utvrđen je kod ekstrakata nevena ($0,27 \pm 0,021$ mmol željezo(II)-sulfat-heptahidrata/g biljnog materijala). Za većinu biljnih ekstrakata, najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je kod ekstrakata dobivenih primjenom parametara ekstrakcije 7 ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 30\text{ min}$, veličina čestica = $< 100\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 500 rpm), kao i u prethodno primijenjenim metodama.

5.6. Korelacije

Tablica 3. prikazuje tablicu korelacija prinosa ekstrakcije, udjela ukupnih polifenola te antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog ABTS, DPPH i FRAP metodama. Broj ispitivanih uzoraka i raspon vrijednosti parametara obično utječu na izračun koeficijenta korelacije (R^2). Veći broj uzoraka i pogodno područje vrijednosti parametara mogu dati povoljne R^2 vrijednosti i reprezentativnu korelaciju (Cai i sur., 2004). Koeficijenti korelacije između prinosa ekstrakcije i određivanih udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta su vrlo niski ($R^2 = 0-0,167$), što ukazuje na puno veći udjel drugih, ekstraktibilnih sastojaka ekstrakata koji čine prinos (suhu tvar) ekstrakata osim polifenolnih spojeva. Koeficijenti korelacija između ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta, mjenog ABTS, DPPH i FRAP metodama, su visoki, pri čemu je najveći koeficijent korelacije izmjeren između udjela

ukupnih polifenola i DPPH metode ($R^2 = 0,825$). Ovi su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja Cai i suradnika (2004) koji su utvrdili vrlo visoku korelaciju udjela ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta 112 različitih ljekovitih biljaka. Također, u radu Kiselove i suradnika (2006) provedeno je istraživanje o korelaciji između antioksidacijskog djelovanja i udjela polifenola vodenih ekstrakata bugarskog ljekovitog bilja, gdje je potvrđena pozitivna korelacija ($R^2 = 0,92$) između antioksidacijskog djelovanja i udjela polifenola, sugerirajući da je antioksidacijski kapacitet posljedica prisutnosti polifenola iz biljnih ekstrakata.

5.7. Statistička analiza glavnih komponenta (PCA metoda)

Kako bi se omogućio bolji uvid u povezanost pojedinih parametara ekstrakcije i bioaktivnih svojstava ispitivanih biljnih vrsta, analiza glavnih komponenta (*Principal Component Analysis*, PCA) korištena je kao tehnika za dokazivanje multivarijatne ovisnosti među varijablama (ispitivani parametri). Analiza glavnih komponenta bavi se tumačenjem strukture matrice varijanci i kovarijanci nekog skupa podataka (izvornih varijabli) pomoću malog broja njihovih linearnih kombinacija. Korištenje ove statističke tehnike omogućuje redukciju podataka, otkrivanje povezanosti među podacima i izvođenje jasno definiranih zaključaka iz vrlo velikog seta podataka, kao što je slučaj u ovom istraživanju. Analiza glavnih komponenta dijeli set podataka u određene manje jedinice koje najbolje opisuju njihovu povezanost te na taj način omogućuje interpretaciju rezultata.

Analiza glavnih komponenta ispitivanih ljekovitih biljnih vrsta provedena je na temelju prinosa ekstrakcije, udjela ukupnih polifenola i njihovog antioksidacijskog djelovanja u ovisnosti i kombinaciji parametara ekstrakcije. Veći rezultat analize (veća vrijednost pojedinog faktora) ukazuje na bolju povezanost s tom komponentom (faktorom). Tablica 4. numerički prikazuje iznose varijanci koje su opisane svakom od izračunatih glavnih komponenti (faktor 1 - faktor 5). Faktor 1 opisuje 59,46% ukupne varijance u zadanom setu podataka, faktor 2 opisuje 20,21%, dok su faktori 3, 4 i 5 odgovorni za 11,74%, 6,19% i 2,39% varijance u setu podataka, redom.

Slika 16. grafički prikazuje distribuciju podataka za faktore 1 i 2. Analiza glavnih komponenta pokazala je grupiranje podataka, odnosno uzoraka u centralnom dijelu, označenih zelenim ovalnim oblikom, osim uzoraka raspršenih na vanjskim dijelovima grafičkog prikaza, točnije uzoraka N7-9 (neven), GT4,7 (gospina trava) i M7 (maslina). Navedeni uzorci pokazali su puno veću raspršenost podataka (uzoraka), što je posljedica

značajnijih razlika u vrijednostima ispitivanih parametara bioaktivnog sastava. Kao što je vidljivo na slici 16, prema rezultatima analize glavnih komponenata, prinos ekstrakcije s najvećom vrijednošću za faktor 2 (tablica 4) bio je brojčano najveći za ekstrakt nevena dobiven pri kombinaciji parametara ekstrakcije 9, uzorak smješten najviše na osi Y, a najmanji za uzorke lipe (L 1 i 6) te gospine trave 6, smještene najniže na osi Y. Osim toga, može se uočiti da je antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom s najnižom (najnegativnijom) vrijednošću faktora 2 (tablica 4) najmanji u uzorcima smještenima najviše desno na osi X te sukladno tome, najviši je u uzorku gospine trave dobivenom pri kombinaciji parametara ekstrakcije 7, smještenom najviše lijevo na osi X. Ovi rezultati potvrđuju rezultate analitičkog određivanja pojedinih bioaktivnih parametara ispitivanih biljnih ekstrakata.

Distribucija uzoraka i njihovo grupiranje prema rezultatima analize glavnih komponenti pokazuju da kombinacije parametara ekstrakcije od 7-9 rezultiraju boljim ekstraktima, izraženijih bioaktivnih svojstava.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata ovog završnog rada doneseni su sljedeći zaključci:

1. Najveći prinosi ekstrakcije i udjeli polifenolnih spojeva zabilježeni su pri upotrebi temperature ekstrakcije od 80 °C
2. Temperatura ekstrakcije je najvažniji parametar vodene ekstrakcije biljnih polifenola
3. Niska korelacija između prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta pokazatelj je prisutnosti većeg udjela drugih topljivih sastojaka, osim polifenolnih spojeva u suhoj tvari proizvedenih ekstrakata
4. Najučinkovitija kombinacija parametara ekstrakcije koja omogućuje ekstrakciju najvećeg udjela ukupnih polifenola je: $T = 80\text{ °C}$, $t = 30\text{ min}$, veličina čestica = $< 100\text{ }\mu\text{m}$ i brzina miješanja = 500 rpm
5. Među ostalim parametrima ekstrakcije, dulje vrijeme ekstrakcije, manja veličina čestica biljnog materijala te veća brzina miješanja utječu na povećanje ekstrakcijske učinkovitosti polifenolnih spojeva
6. Visoka korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidacijskoga kapaciteta mjerenog ABTS, DPPH i FRAP metodom dokazuje da je visok udjel polifenola odgovoran za visoki antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata
7. Rezultatima PCA analize potvrđeni su rezultati analitičkog određivanja pojedinih bioaktivnih parametara ispitivanih biljnih ekstrakata

7. LITERATURA

- Anonymous 1, <<http://www.cuvarkuca.hr/preporuka/neven-biljka-koze/>>. Pristupljeno 25.travnja 2016.
- Anonymous 2, <<http://covermagazin.com/caj-gospina-trava.htm>>. Pristupljeno 20. travnja 2016.
- Anonymous 3, <<http://www.privredni.hr/vijesti/24-analize/975-losija-godina-za-maslinare>>. Pristupljeno 20.travnja 2016.
- Anonymous 4, <<http://zenstvena.com/sve-zdravstvene-prednosti-caja-od-lipe/>>. Pristupljeno 21.svibnja 2016
- Anonymous 5, <<http://www.kleraderm.com/prodotti-2-2/spa/olii-essenziali/ol21-eucalipto-3/>>. Pristupljeno 21.svibnja 2016.
- Anonymous 6, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Maj%C4%8Dina_du%C5%A1ica>. Pristupljeno 21. svibnja 2016.
- Anonymous 7, <<http://www.uskinfo.ba/vijest/najljekovitije-biljke-svijeta-metvica-menta/12234>>. Pristupljeno 21.svibnja 2016.
- Anonymous 8, <<http://www.val-znanje.com/index.php/ljekovite-biljke/1093-kadulja-sativa-officinalis-1>>. Pristupljeno 22.svibnja 2016.
- Anonymous 9, <<http://www.svijet-biljaka.hr/2015/index.php/sadnice/melisa>>. Pristupljeno 22.svibnja 2016.
- Anonymous 10, <<http://prirodnodozdravlja-ljekovitobilje.blogspot.hr/2012/06/poljska-preslica.html>>. Pristupljeno 22.svibnja 2016.
- Bart, H.-J. (2011) Extraction of natural products from plants – an introduction. U: Industrial scale natural products extraction, (Bart, H.-J., Pilz S., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 1-25. doi: 10.1002/9783527635122.ch1
- Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **59**, 205-212.
- Bradley, P. (1992) British herbal comendium: A handbook of scientific information on widely used plant drugs, 1. izd., British Herbal Medicine Association, Dorset, str. 92- 94.
- Brahmi, F., Madani, K., Dahmoune, F., Rahmani, T., Bousbaa, K., Oukmanou, S., Chibane, M. (2012) Optimisation of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from algerian mint (*Mentha spicata* L.). *Phcog. Commn.* **2(4)**, 72-86.

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **74**(17), 2157-2184.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J.Ethnopharmacol* **106**, 290–302.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**(10), 7313-7352.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol. Biotech.* **51**(1), 84-91.
- Drużyńska, B., Stępniewska, A., Wołosiak, R. (2007) The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **6**(1), 27-36.
- Fu, L., Xu, B.-T., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xu, X.-R., Xia, E.-Q., Li, H.-B. (2011) Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 2112-2124.
- Hajlaoui, H., Ben, A.F., Mejdı, M., Noumi, E., Bakhrouf, A. (2010) Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4**, 1122-1127.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. Rakesh, D.D. (2008) Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International centre for science and high technology, Trieste.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* **55**, 481-504.
- Hu, F., Lu, R., Huang, B., Liang, M. (2004) Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia* **75**(1), 14-23.

Huie, C.W. (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 23–30.

Iudina, Y. (2015) The study of the calendula flowers extraction process. *News pharm.* **3(83)**, 28-31.

Jonas, W.B. (1997) Researching alternative medicine. *Nat. Med.* **3**, 824–882.

Jovanović, A., Đorđević, V., Zdunić, G.M., Šavikin, K.P., Pljevljakušić, D., Bugarski, B.M. (2016) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity. *Hem. Ind.* **00**, 44-68. doi:10.2298/HEMIND150629044J

Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S., Makris, D.P. (2015) Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2(1)**, 1–8.

Karalleidie, L., Gawarammana, I. (2008) Traditional herbal medicines: a guide to their safer use. Hammersmith Press, London.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **(55)** 279-290.

Kemmerich, B., Eberhardt, R., Stammer, H. (2006) Efficacy and tolerability of a fluid extract combination of thyme herb and ivy leaves and matched placebo in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. A prospective, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arzneim.-Forsch.* **56(9)**, 652-660.

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. (2006) Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother. Res.* **20(11)**, 961-965.

Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S., Berendika, M. (2011) Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochem. Anal.* **22(2)**, 172-180.

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

- Li, H.-B., Wonga, C.-C., Chenga, K.-W., Chena, F. (2008) Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Technol.* **41(3)**, 385–390.
- Linde, K., Berner, M.M., Kriston, L. (2008) St John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**. doi: 10.1002/14651858.CD000448.pub3
- Mantle, D., Eddeb, F., Pickering, A.T. (2000) Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J. Ethnopharmacol.* **72(1-2)**, 47-51.
- Milutinović, M., Radovanović, N., Rajilić-Stojanović, M., Dimitrijevic-Brankovic, S.I. (2014) Microwave-assisted extraction for the recovery of antioxidants from waste *Equisetum arvense*. *Ind. Crops Prod.* **61**, 388-397.
- Miralai, S., Khan, M.M., Islam, M.R. (2007) Replacing artificial additives with natural alternatives. *J. Nat. Sci. Technol.* **1(3)**, 403-434.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* **1054**, 95–111.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **41**, 1523–1542.
- Noorhajati, H., Tanjung, M., Aminah, N.S., Suwandi, J.S.A. (2012) Antioxidant activities of extracts of trengguli stem bark (*Cassia fistula* L.). *J. Basic Appl. Sci.* **12**, 85-89.
- Pandey, K.B., Rizvi S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2(5)**, 270-278.
- Pohajda, I., Ševar, M., Roša, J., Kovač, M. (2009) Koraci do ekoznaka za ljekovito i aromatično bilje. Hrvatski zavod za poljoprivrednu savjetodavnu službu, Zagreb, str.2.
- Saberi, M., Kazemisaleh, D., Bolurian, V. (2008) Effect of olive leaf on mild to moderate hypertension resistant to normal treatments. *J. Med. Plants* **7(27)**, 52-59.
- Şahin, S., Samli, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **20(1)**, 595-602. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.029

Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 215-217.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158.

Soriguer, F., Rojo-Martínez, G., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Caballero-Díaz, F., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castaño, L., Castell, C., Catalá, M., Delgado, E., Franch, J., Gaztambide, S., Gírbés, J., Gomis, R., Gutiérrez, G., López-Alba, A., Martínez-Larrad, M.T., Menéndez, E., Mora-Peces, I., Ortega, E., Pascual-Manich, G., Serrano-Rios, M., Urrutia, I., Valdés, S., Vázquez, A., Vendrell, J. (2013) Olive oil has a beneficial effect on impaired glucose regulation and other cardiometabolic risk factors. *Eur. J. Clin. Nutr.* **67**, 911-916.

Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C.A., Bodirlau, R., Armatu, A. (2011) Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Nat. Prod. Res.* **25(17)**, 1657-1661. doi: 10.1080/14786419.2010.521502

Šamec, D. (2013) Fitokemijska i genetska istraživanja endemskih vrsta *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*. Doktorski rad, Zagreb.

Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R. Jr., Leal, P.F., Meireles, M. A.A. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. U: Extracting bioactive compounds from food products (Meireles, M. A.A., ured.), Crc press, Taylor& Francis group, New york, str. 137-218.

Verpoorte, R. (2000) Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm. Pharmacol.* **52**, 253–262.

Žuškin, E., Pucarín Cvetković, J., Kanceljak Macan, B., Vitale, K., Janev Holcer N., Čivljak M. (2013) Umijeće liječenja: povijesni prikaz. *Soc. Psi.* **41(3)**, 156-163.