

# Modeliranje i optimiranje fizikalno-kemijskih karakteristika i UV spektara vodenih ekstrakata lavande i melise

---

Cvetković, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:374007>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2017.

Ana-Marija Cvetković

830/N

**MODELIRANJE I OPTIMIRANJE  
FIZIKALNO-KEMIJSKIH  
KARAKTERISTIKA I UV  
SPEKTARA VODENIH  
EKSTRAKATA LAVANDE I  
MELISE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jasnke Gajdoš Kljusurić, te uz pomoć dr.sc. Tamare Jurina.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se najboljoj mentorici prof. dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na ukazanoj prilici, savjetima i pristupačnosti. Također se zahvaljujem dr.sc. Tamari Jurina na pomoći prilikom izvedbe ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, braći, dečku i prijateljima na podršci koju su mi pružali prilikom studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Nutricionizam

### MODELIRANJE I OPTIMIRANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH KARAKTERISTIKA I UV SPEKTARA VODENIH EKSTRAKATA LAVANDE I MELISE

*Ana-Marija Cvetković, 830/N*

**Sažetak:** Hrana koju konzumiramo sastoji se od velikog broja poznatih i nepoznatih biološki aktivnih sastojaka koji su prisutni u malim količinama, ali imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Danas se sve više pozornosti pridaje samoniklom bilju, bilo u formi čajeva, ulja ili začina, koje je od davnina prisutno u ljudskoj upotrebi. U ovom radu istraživani su vodeni ekstrakti lavande i melise. Za svaku biljku provedene su ekstrakcije pri temperaturama 40 °C, 60 °C, 80 °C sa izuzimanjem uzoraka u pravilnim vremenskim intervalima. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati odnos fizikalnih parametara u vodenim biljnim ekstraktima s obzirom na temperature i vrijeme trajanja ekstrakcije i odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u ekstraktima te im izmjeriti antioksidacijsku aktivnost primjenom ABTS metode. Primjenom jednostavnih linearnih regresijskih modela utvrđena je postojanost veze između fizikalnih i kemijskih parametara vodenih ekstrakata istraživanih biljaka. Provela se i UV-VIS spektroskopska analiza uzoraka čiji spektri su korišteni u modelima parcijalne linearne regresije metodom najmanjih kvadrata, tzv. PLS regresija. Primjenom PLS regresije može se zaključiti kako se UV spektroskopija pokazala kao potencijalno uspješna metoda u predikciji fizikalnih i kemijskih karakteristika istraživanih biljnih ekstrakata. Značajna odstupanja između eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih primjenom PLS modela primjećena su za antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom.

**Ključne riječi:** samoniklo ljekovito bilje, polifenoli, antioksidacijska aktivnost, UV spektroskopija, multivarijatna analiza

**Rad sadrži:** 53 stranice, 24 slike, 6 tablica, 45 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. Jasenka Gajdoš Kljusurić*

**Pomoć pri izradi:** *Dr.sc. Tamara Jurina*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Davor Valinger*
2. Prof.dr.sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
3. Doc.dr.sc. *Maja Benković*
4. Doc.dr.sc. *Danijela Bursać-Kovačević* (zamjena)

**Datum obrane:** srpanj, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Process Engineering**  
**Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### MODELLING AND OPTIMIZING PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND UV SPECTRA OF WATER EXTRACTS OF LAVANDER AND MELISSA

*Ana-Marija Cvetković, 830/N*

**Abstract:** The food we consume consists of a large number of known and unknown bioactive compounds present in small quantities, which have positive effects on human health. Today, increased attention has been given to medicinal plants in the form of teas, oils or spices, which people have been using since ancient times. In this research, aqueous extracts of lavender and melissa were investigated. For each medicinal plant, extractions were performed at 40 °C, 60 °C, and 80 °C with sampling at regular time intervals. The aim of this study was to investigate the relations between physical parameters in aqueous plant extracts with regard to the temperature and duration of extraction, determine the total polyphenolic content in aqueous extracts and measure their antioxidative activity by ABTS method. Using simple linear regression models, strong correlations between physical and chemical parameters of aqueous plant extracts were determined. UV-VIS spectroscopic analysis of samples was also conducted and spectra were used in the partial linear regression modelling (Partial Least Squares, PLS). Applying the modelling using partial linear regression, it can be concluded that UV spectroscopy turned out to be a potentially successful method for predicting physical and chemical characteristics of the investigated aqueous plant extracts. Significant differences between the experimental results and the results obtained applying the PLS model were detected for the antioxidative activity determined by ABTS method.

**Keywords:** wild medicinal plants, polyphenols, antioxidative activity, UV spectroscopy, multivariate analysis

**Thesis contains:** 53 pages, 24 figures, 6 tables, 45 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:** *PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Tamara Jurina*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
2. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
3. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor
4. PhD. *Danijela Bursać-Kovačević*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** July, 2017.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. SAMONIKLO BILJE.....	2
2.1.1. Lavanda .....	2
2.1.2. Melisa .....	3
2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE U HRANI .....	4
2.3. PREHRANA BOGATA POLIFENOLIMA I ANTIOKSIDANSIMA.....	5
2.3.1. Polifenoli .....	5
2.3.2. Flavonoidi.....	6
2.3.3. Oksidacijski stres i uloga antioksidansa .....	6
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA .....	7
2.5. MJERNE METODE PRAĆENJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	8
2.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS <sup>+</sup> metodom .....	9
2.6. FOLIN-CIOCALTEU METODA ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA .....	10
2.7. SPEKTROSKOPSKE TEHNIKE .....	10
2.7.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	12
3.1. MATERIJALI .....	12
3.1.1. Uzorci .....	12
3.1.2. Pribor i aparatura .....	12
3.1.3. Otapala i reagensi .....	13
3.2. METODE .....	14
3.2.1. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata pri različitim temperaturama .....	14
3.2.2. Određivanje fizikalnih karakteristika vodenih ekstrakata .....	14
3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja .....	15
3.2.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....	15
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	17
3.2.6. UV-VIS spektroskopija .....	19
3.2.7. Obrada podataka i modeli.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23
4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA FIZIKALNIH KARAKTERISTIKA VODENIH EKSTRAKATA LAVANDE I MELISE .....	24



4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VODENIH EKSTRAKATA LAVANDE I MELISE .....	30
4.3. REGRESIJSKI MODELI ODNOSA PROMATRANIH PARAMETARA .....	35
4.4. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI (eng. Principal Component Analysis, PCA).....	37
4.5. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA.....	39
4.5.2. Primjena parcijalne regresije metodom najmanjih kvadratau promatranju odnosa UV spektara i fizikalno-kemijskih karakteristika vodenih ekstrakata lavande i melise.....	40
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>49</b>

# 1. UVOD

Hrana koju konzumiramo sastoji se od velikog broja poznatih i nepoznatih biološki aktivnih sastojaka koji su prisutni u malim količinama, ali imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Danas se sve manje vjeruje antibioticima, lijekovima i hrani koja je tretirana kemijskim sredstvima. Puno ljudi pokušava konzumirati namirnice iz ekološkog uzgoja te poznatog i provjerenog podrijetla. Prednost se daje samoniklom bilju, bilo u formi čajeva, ulja ili začina, koje je od davnina prisutno u ljudskoj upotrebi. Fenolne komponente koje mnoge biljke sadrže stekle su veliku popularnost otkrivanjem njihove karakteristične antioksidacijske aktivnosti te potencijalno korisnih učinaka koje mogu imati na ljudsko zdravlje.

Lavanda i melisa predstavljaju bogat izvor različitih skupina fenolnih spojeva kojima se pripisuju antioksidacijska, antibakterijska, antitumorna, protuupalna i druga svojstva. Ulje lavande koristi se kao komponenta za okus prehrambenih proizvoda, alkoholnih i bezalkoholnih pića, u želatinama, no njezina najčešća primjena je u mirisnim kupkama, sapunima i parfemima.

Melisa se najčešće koristi za liječenje rana, čireva, glavobolje, depresije te za smirenje želučanih tegoba i menstrualnih grčeva.

U ovom radu istraživani su vodeni ekstrakti lavande i melise, pri čemu se melisa najčešće koristi kao biljni čaj dok se lavanda koristi u obliku eteričnih ulja. Za svaku biljku provedene su ekstrakcije pri različitim temperaturama, tijekom određenog vremenskog perioda. U odgovarajućim vremenskim intervalima izuzimani su uzorci vodenih ekstrakata kojima su određivane fizikalne (pH, vodljivost, ukupne otopljene tvari i suha tvar) i kemijske (ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet) karakteristike. Također je korištena i jedna od novijih metoda analize uzoraka, UV-VIS spektroskopija.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati odnos fizikalnih parametara u vodenim biljnim ekstraktima s obzirom na temperaturu i vrijeme trajanja ekstrakcije, odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u ekstraktima te im izmjeriti antioksidacijsku aktivnost primjenom ABTS metode. Također se htjela ispitati ovisnost udjela ukupnih polifenola o fizikalnim parametrima, te na osnovu snimljenih UV spektara predvidjeti fizikalno-kemijske karakteristike vodenih ekstrakata lavande i melise.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. SAMONIKLO BILJE

Biljke su važan izvor molekula koje mogu biti korisne kao lijek. Proizvodnja mnogih lijekova temelji se na poznavanju ljekovitog djelovanja biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini. Biljni lijekovi se često koriste kao sirovi biljni pripravci nastali iz cijele biljke, iz sušenih biljnih dijelova ili kao biljni ekstrakti. Međutim, sve je veći interes za identificiranje aktivnih komponenata koje su prisutne u biljkama kako bi ih se koristilo za razvoj farmaceutskih lijekova u medicini.

#### 2.1.1. Lavanda

Lavanda (*Lavandula officinalis*) pripada porodici *Lamiaceae* (usnjača) koje su rasprostranjene u zemljama Mediterana, osobito Španjolske i Francuske. Lavanda je višegodišnja, zimzelena biljka s cvjetovima ljubičaste boje (slika 1). Od aktivnih komponenata sadrži esencijalno ulje koje sadrži više od stotinjak sastojaka poput linalil acetata, linalola, flavonoida, tanina i kumarina. Cvjetovi i ulje lavande koriste se u pripravcima za čajeve. Također se koriste i kao komponente za okus prehrambenih proizvoda, uključujući alkoholna i bezalkoholna pića, pečene namirnice, meke bombone te želatinu. Najčešća primjena ulja lavande je u mirisnim kupkama, sapunima i parfemima (Singh, 2001). Istraživanja pokazuju kako ulje lavande smanjuje razinu hormona stresa i smanjuje aktivnost slobodnih radikala (Atsumi i Tonosaki, 2007). Ulje lavande utječe na razinu lipida i kolesterola u krvi (Siurin, 1997). Također utječe na smanjenje reumatskih i mišićnih bolova (Billany i sur., 1995). Lavanda se navodi kao jaki antidepresiv sa antioksidacijskim, antibakterijskim i antimikrobnim svojstvima (Sokovic i sur., 2010).



**Slika 1.** *Lavandula officinalis* (Anonymous 1, 2017)

### 2.1.2. Melisa

Melisa (*Melissa officinalis*), odnosno matičnjak je višegodišnja biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*. Melisa raste na istočnom dijelu Mediterana i zapadnoj Aziji. To je mala biljka, do visine jednog metra. Biljka koja je vrlo aromatična. Cvjetovi su bijele ili žućkaste boje koje cvatu od sredine lipnja do listopada (slika 2).

Od aktivnih komponenata u svom sastavu ima esencijalno ulje (linalol, eugenol, geraniol), polifenole, flavonoide, tanine, sukcinu kiselinu i ružmarinsku kiselinu (Carnat i sur., 1998). Najpoznatija upotreba melise je u pripravcima za čajeve (Wheatley, 2005). Tradicionalno se koristi za liječenje rana, čireva, pčelinjih uboda, oslobađa napetost, smiruje živce i glavobolju (Horrigan, 2005). Također se koristi za liječenje astme, želučanih tegoba, groznice i menstrualnih grčeva (Herodez i sur., 2003).

Vodeni i alkoholni ekstrakti melise koriste se za liječenje groznica i prehlada, probavnih smetnji, depresije, nesanic i glavobolje (Carnat i sur., 1998). Također se pokazalo da melisa posjeduje antimikrobno, antibakterijsko, antimutageno, antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje (Spiridon i sur., 2011). Melisa ima veliku antioksidacijsku aktivnost zbog fenolnih spojeva i ružmarinske kiseline (Triantaphyllou i sur., 2001). Utvrđeno je da eterično ulje melise posjeduje veliku antioksidacijsku aktivnost koja je vrlo djelotvorna protiv niza humanih stanica linije raka (de Sousa i sur., 2004).



**Slika 2.** *Melissa officinalis* (Anonymous 2, 2017)

## **2.2. BIOAKTIVNE KOMPONENTE U HRANI**

Posljednjih godina došlo je do velikog porasta interesa za biljnim lijekovima u svijetu djelomično zbog saznanja da primjena sintetskih lijekova i njihove posljedice često nepoželjno utječu na ljudski organizam. Za razliku od sintetskih lijekova koji često sadrže jednu, biljni ekstrakti sadrže velik broj aktivnih komponenata. Taj velik broj aktivnih komponenata mogu djelovati sinergistički unutar ljudskog organizma i mogu imati izvanredna terapijska svojstva uz minimalna ili nikakva nepoželjna svojstva (Jayathilake i sur., 2016). Biološki aktivni sastojci hrane su tvari prisutne u hrani najčešće u malim količinama, s dokazanim, povoljnim i nepovoljnim, učinkom na zdravlje ljudi. Odlikuju se sposobnošću da svojom biološkom aktivnošću smanje ili potpuno uklone učinak štetnih tvari u ljudskom organizmu. Osim poželjnog učinka na zdravlje, pojam biološke aktivnosti može se odnositi i na nepovoljne učinke na organizam i tada govorimo o toksičnosti tih sastojaka. Biološki aktivni sastojci hrane međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji u organizmu, a tu se ubrajaju razne skupine spojeva: vitamini, minerali, enzimi, karotenoidi, fitosteroli, glukozinolati, polifenolni spojevi, glikozidi, alkaloidi i druge tvari prisutne u hrani. Navedeni spojevi, uneseni i prisutni u organizmu u odgovarajućim količinama, mogu povoljno utjecati na zdravlje čovjeka tj. na različite organske sustave kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, nervni, imunološki i drugi (Jašić, 2010).

## 2.3. PREHRANA BOGATA POLIFENOLIMA I ANTIOKSIDANSIMA

Ljudi i dalje nisu svjesni koliko im je pravilna prehrana bitna u životu. Pravilna prehrana je ona prehrana koja tijelu osigurava optimalan unos kalorija, vitamina, minerala i tekućine, te optimalan omjer ugljikohidrata, masti i bjelančevina kako bi se zadovoljile energetske potrebe organizma, te potrebe za gradivnim i zaštitnim tvarima. Velika se pozornost pridaje oksidacijskom stresu koji organizam mora podnijeti ukoliko se jede nekvalitetno i mogu li, te na koji način, antioksidansi pomoći u tome.

### 2.3.1. Polifenoli

Polifenoli su bioaktivni biljni produkti, raznolika skupina sekundarnih metabolita koji su uključeni u brojne metaboličke procese. Najčešće su prisutni u listovima, cvjetovima i drvenastim dijelovima biljaka.

Polifenoli u biljkama imaju višestruku ulogu (Tapas i sur., 2008):

- utječu na organoleptička svojstva (okus, aroma, boja)
- utječu na rast biljke
- utječu na otpornost prema nekim bolestima i mikroorganizmima.

Fenolni spojevi su vrlo dobri antioksidansi (Tapas i sur., 2008). Za visoku antioksidacijsku aktivnost zaslužan je njihov redoks potencijal pri čemu djeluju kao donori vodikova atoma (Amarowicz i sur., 2004).

Epidemiološke studije su povezale polifenole sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, što se pripisuje izravnom djelovanju polifenola na krvne žile i endotelne stanice. Takav učinak se osobito pripisuje polifenolima u čajevima, bobicama i grožđu (Valls-Pedret i sur., 2012).

Mnogi fenolni spojevi imaju veliku antioksidacijsku aktivnost te antikancerogeno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje (Veeriah i sur., 2006). Zastupljenost i raznolikost fenolnih spojeva u biljnom svijetu je velika.

S obzirom na strukturne karakteristike polifenola, razlikujemo dvije veće podskupine:

- 1) Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne)
- 2) Flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani i dr.) (Kazazić, 2004).

Važni prehrambeni izvori polifenola su luk (flavonol), kakao, sjemenke grožđa (proantocijanidin), čaj, jabuke, crno vino (katehin, flavonol), bobice i trešnje (antocijanidin), agrumi (flavanon) i soja (izoflavon) (Nichols i Katiyar, 2010).

### 2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Nalaze se u mnogim biljkama, lišću, cvijeću, koži ili kori voća, kori drveća, orašastim plodovima, sjemenkama, čaju te vinu (Sandhar i sur., 2011). Naime, velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost. Flavonoidi mogu spriječiti oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima na različite načine. Antioksidacijska aktivnost se bazira na primanju nesparenih elektrona slobodnih radikala, doniranju vodikova atoma, keliranju iona prijelaznih metala, aktiviranju antioksidacijskih enzima, inhibiranju oksidaze i sinergističkom djelovanju s fiziološkim antioksidansima. Flavonoidi posjeduju antibakterijsko, antialergijsko, antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Kazazić, 2004).

### 2.3.3. Oksidacijski stres i uloga antioksidansa

Antioksidansi su spojevi koji neutraliziraju slobodne radikale na način da im doniraju jedan od svojih elektrona. Međutim, antioksidans predajom elektrona ne postaje slobodni radikal, već i u takvoj formi ostaje stabilan (Singh i sur., 2013).

U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidacijskog stresa, tj. oštećenja koje radikali i oksidansi izazivaju na površinskim membranama i receptorima. Ako izostane antioksidacijska zaštita protiv nastalih slobodnih radikala, može doći do oksidacijskog stresa na nekoliko načina zbog djelovanja određenih toksina ili fiziološkim stresom. Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kisika koje uključuju peroksidni radikal-anion, hidroksilni radikal, hidroperoksidni radikal, vodikov peroksid i lipidne peroksidne radikale, uključeni su u razvojne procese brojnih bolesti, kao što su: astma, tumori, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, gastrointestinalne upalne bolesti i drugi upalni procesi (Prior i Xu, 2013). Oni pridonose starenju stanica, mutageni, karcinogeni i koronarnim bolestima srca putem destabilizacije membrana, oštećenja DNA i oksidaciji lipoproteina niske gustoće (LDL). Te reaktivne vrste kisika nastaju kao normalna posljedica biokemijskih procesa u tijelu, ali i kao rezultat povećanoga izlaganja okolišnim i/ili prehrambenim ksenobioticima. Općenito, slobodni radikali vrlo su reaktivni i mogu npr. oštetiti lipidnu membranu stvarajući ugljikov radikal koji reagira s kisikom i nastali peroksidni radikal

dalje reagira s masnim kiselinama stvarajući nove ugljikove radikale. Upravo zbog potencijalno štetne prirode slobodnih radikala u tijelu postoje različiti antioksidacijski mehanizmi obrane uključujući enzime, proteine, antioksidanse topljive u vodi i u mastima te flavonoide u svojstvu hvatanja slobodnih radikala (Kazazić, 2004).

Reaktivni kisikovi spojevi mogu se ukloniti nizom enzimskih i neenzimskih antioksidacijskih mehanizama. Enzim superoksid dismutaza pretvara kisikov superoksid u vodikov peroksid koji se dalje razgrađuje do vode i molekularnog kisika djelovanjem glutacion peroksidaze ili katalaze u mitohondrijima ili lizosomima.

Neenzimskim antioksidansima pripadaju vitamini (A, C, E), glutation, karotenoidi, koenzim Q10, elementi u tragovima (bakar, cink i selen) (Johansen i sur., 2005). Razna istraživanja su pokazala da konzumiranje hrane bogate tzv. prirodnim antioksidansima doprinosi jačanju obrambenog sustava ljudskog organizma. Zato je pozornost usmjerena na razvoj i izolaciju prirodnih antioksidansa iz biljnih izvora. Osim vitamina, prirodni antioksidansi mogu biti i fenolni spojevi (flavonoidi, fenolne kiseline i tanini) (Amarowicz i sur., 2004).

## **2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA**

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Klasične metode ekstrakcije obuhvaćaju ekstrakciju otapalima, perkolaciju, maceraciju i Soxlet ekstrakciju. Budući da klasične metode zahtijevaju veći volumen otapala, sve češće se koriste alternativne metode ekstrakcije uz upotrebu manjih volumena otapala. Alternativne metode ekstrakcije su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim tekućinama, ubrzana ekstrakcija otapalima i ekstrakcija pomoću hladne atmosferske plazme (Lloyd i van Wyk, 2012). Postupci koji često prethode ekstrakciji fenolnih spojeva obuhvaćaju usitnjavanje, sušenje ili liofilizaciju uzorka, a često se cijeli uzorak u svježem stanju potapa u odgovarajuće otapalo. Prilikom izbora otapala potrebno je uzeti u obzir da otapalo ima niski viskozitet, da ne reagira sa ekstraktom, niti se razgrađuje, da je otapalo stabilno na kisik, svjetlo i temperaturu, da otapalo nije zapaljivo te škodljivo za okolinu. Osnovni faktori koji utječu na ekstrakciju su: veličina čestica, vrste fenola, vrste i polarnosti otapala, odnos otapala i uzorka, vrijeme i temperatura ekstrakcije (Teixeira i sur., 2014). U ovom radu korištena je voda kao otapalo odnosno korišteni su vodeni ekstrakti samoniklog bilja, jer su biljni čajevi jako zastupljeni u svakodnevnoj prehrani.



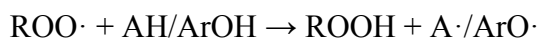
## 2.5. MJERNE METODE PRAĆENJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se različite metode kao što su:

- Briggs- Rauscher metoda (Cervellati i sur., 2002)
- DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom) (Brand-Williams i sur., 1995)
- FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1996)
- ABTS<sup>+</sup> metoda (radikal kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) (Re i sur., 1999)
- ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Prior i sur., 2005)
- TEAC metoda (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Apak i sur., 2013)
- TRAP metoda (Total Reactive Antioxidant Potential) (Apak i sur., 2013).

Mjerne metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti mogu se podijeliti u dvije grupe, odnosno dijele se na HAT (eng. hydrogen atom transfer) i ET (eng. electron transfer) metode.

**HAT metode** temelje se na prijenosu vodika. Mehanizam djelovanja se može prikazati reakcijom u kojem se vodikov atom (H) fenolnih spojeva (Ar-OH) prenosi na slobodni radikal (ROO·):



gdje je fenoksil radikal, nastao reakcijom fenola i peroksid radikala, stabilan zahvaljujući rezonanciji. Ako se rezultati dobiju različitim metodama oni su teško usporedivi zbog različitog mehanizma reakcije, pH, redoks potencijala i sl. (Apak i sur., 2013).

U HAT metode spadaju:

- ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
- TRAP metoda (Total Reactive Antioxidant Potential).

Metode bazirane na prijenosu elektrona (**ET metode**) imaju određeno vrijeme trajanja za određene redoks reakcije i mjere termodinamičku pretvorbu, odnosno oksidaciju, u tom vremenskom razdoblju. Antioksidans reagira s oksidirajućim sredstvom, odnosno s fluorescentnom probom umjesto s peroksidoidnim radikalom. Spektrofotometrijske metode mjere intenzitet obojenja. Stupanj promjene boje (bilo porast ili smanjenje apsorbancije probe

pri određenoj valnoj duljini) u korelaciji je s koncentracijom antioksidansa u uzorku (Apak i sur., 2013).

U ET metode spadaju:

- FCR (Folin-Ciocalteu reagens) (Singleton i sur., 1999).
- FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power)
- DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom)
- CUPRAC (Cupric Iron Reducing Antioxidant Capacity) (Apak i sur., 2013)
- TEAC metoda (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity)
- ABTS<sup>+</sup> metoda (radikal kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)).

#### 2.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS<sup>+</sup> metodom

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. 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 (Re i sur., 1999).

ABTS metoda prihvaćena je kao pouzdana metoda u analizi hrane i kliničkim istraživanjima. Ovaj spektrofotometrijski test je jednostavan, brz i prikladan za određivanje antioksidansa u hranjivim sastojcima (Prior i sur., 2005).

## **2.6. FOLIN-CIOCALTEU METODA ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA**

Folin-Ciocalteu test (FC) najpopularnija je metoda određivanja ukupnih fenola. Metodu su izvorno razvili Folin i Ciocalteu 1927. godine. Metoda mjeri promjenu boje od žute, dodatkom Folin-Ciocalteovog reagensa, u tamnoplavu u prisutnosti uzoraka. Mjeri se spektrofotometrom pri valnim duljinama 750–765 nm. Galna kiselina je najčešće korišten standard i rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po litri ili gramu uzorka. Glavna prednost ove metode je to da je vrlo jednostavna, precizna, ponovljiva i jeftina. Jedan od nedostataka je taj što su moguće smetnje nekih drugih redukcijskih sredstava, no FCR metoda i dalje ostaje vrlo popularna metoda (Singleton i sur., 1999).

## **2.7. SPEKTROSKOPSKE TEHNIKE**

Spektroskopske tehnike čine veoma važnu skupinu u instrumentalnoj kemijskoj analizi. Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) se prvenstveno upotrebljava za određivanje koncentracije metala u hrani. Nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR) je moguće koristiti za mjerenje masti ili topljivih sastojaka mliječnih proizvoda. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija (UV-VIS) je pomoćna (a često i glavna) metoda za identifikaciju prirodnih komponenata kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), ukupni fenoli, flavonoidi, ukupni antocijani, monomerni antocijani i ukupna antioksidacijska aktivnost (Šišić i Kuli, 2014). Infracrvena spektroskopija (IR) ima mnoge prednosti jer omogućuje brzo mjerenje velikog broja čestica, a da se pri tome uzorak ne uništi. Od tehnika bliske infracrvene spektroskopije koriste se bliska infracrvena spektroskopija (eng. Near Infrared Spectroscopy, NIRs) i bliska infracrvena emisija (eng. Near Infrared Transmission, NIT). Ove tehnike mogu se koristiti za analizu tekućina i čvrstih materijala kao što su mlijeko, sirevi i mlijeko u prahu (Karomi i sur., 2003).

### **2.7.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija**

Spektrofotometrija je kvantitativno mjerenje refleksijskih ili transmisijskih svojstava nekog materijala s obzirom na valne duljine. Spektrofotometrija može mjeriti u vidljivoj svjetlosti, u ultraljubičastom području ili infracrvenom području elektromagnetskog spektra.

Ultraljubičasta i vidljiva (UV-VIS) spektroskopija zasnivaju se na osobini molekula da apsorbiraju elektromagnetsko zračenje ultraljubičastog (100–380 nm) i vidljivog (380–800 nm) dijela spektra (Penner, 2010).

Spektrofotometrija uključuje uporabu spektrofotometra. To je poseban fotometar (svjetlomjer) koji može mjeriti intenzitet različitih valnih duljina. Najčešći su tzv. UV-VIS spektrofotometri.

UV-VIS spektrofotometar je uređaj za analizu ultraljubičastog i vidljivog djela spektra elektromagnetskog zračenja. U osnovi se sastoji od izvora svjetlosti, uzorka, monokromatora i detektora. Izvor svjetlosti emitira svjetlosnu zraku konstantne energije. Monokromator selektira jednu valnu duljinu svjetlosti i propušta je kroz uzorak koji se nalazi u kiveti. Ukoliko uzorak apsorbira svjetlost, intenzitet propuštenog zračenja se smanjuje. Za ultraljubičastu i vidljivu spektroskopiju koristi se tekući uzorak smješten u kiveti koja ima ravne površine načinjene od kvarcnog stakla. Staklo je pogodno za vidljivu, ali ne i ultraljubičastu spektroskopiju zato što apsorbira UV zračenje (Penner, 2010).

Spektrofotometrija je vrlo bitna metoda za identifikaciju prirodnih komponenata, kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), ukupni fenoli, flavonoidi, antocijani, ukupna antioksidacijska aktivnost. Njene prednosti nad ostalim metodama su u izuzetno velikoj osjetljivosti i jednostavnom rukovanju instrumentom (Jia i sur., 1999).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci

U ovom radu korišteno je sljedeće osušeno samoniklo bilje, kupljeno od dobavljača SUBAN d.o.o., Strmec Samoborski:

- Lavanda (*Lavandula x hybrida* L.) iz Međimurske županije, berba 2015.
- Melisa (*Melissa officinalis* L.) iz Virovitičko-podravske županije, berba 2014.

#### 3.1.2. Pribor i aparatura

Pribor:

- Staklene čaše volumena 100 mL, 300 mL, 800 mL, 2000 mL
- Stakleni lijevak
- Filter papir
- Električno kuhalo
- Magnet
- Magnetska mješalica
- Menzura volumena 500 mL
- Stakleni štapić
- Metalna špatula
- Aluminijske posude s poklopcem
- Stalak za epruvete
- Staklene epruvete
- Odmjerne tikvice volumena 10 mL i 500 mL
- Pipete volumena 5 i 10 mL
- Mikropipete volumena 100  $\mu$ L i 500  $\mu$ L
- Kiveta od kvarcnog stakla

#### Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius, TE214S-OCE, Njemačka)
- Tehnička vaga (Tehničar Servag, Hrvatska)
- Uljna kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- Termometar (Iskra 0AT0611, Slovenija)
- Laboratorijski sušionik (Inko, ST605, Hrvatska)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- Vorteks (Biosan Vortex V-1 plus, Latvija)
- Konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)

#### 3.1.3. Otapala i reagensi

U eksperimentalnom radu korištena su sljedeća otapala i reagensi:

- Destilirana voda
- Kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm (Samoborka, Samobor, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 20%-tna otopina natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, SAD)
- Etanol (96 %-tni) (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- kalijev peroksodisulfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ )(Fluka, Švicarska)
- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskakiselina)diamonijeve soli (ABTS) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, Njemačka)

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata pri različitim temperaturama**

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata temelji se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010).

U staklenu čašu volumena 2000 mL odvaži se 30 g osušenog samoniklog bilja (veličine čestica u rasponu od 3000–4000  $\mu\text{m}$ ) te se prelije sa 1500 mL destilirane vode, prethodno zagrijane na unaprijed definiranoj temperaturi (40 °C, 60 °C i 80 °C). Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na definiranoj temperaturi u uljnoj kupelji (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka) pri brzini miješanja 500 okretaja u minuti, 90 minuta. U pravilnim vremenskim intervalima (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 70; 80; 90 min) izuzima se 6 mL uzorka iz ekstrakcijske smjese, uzorci se odmah hlade u smjesi leda te se filtriraju (100 %-tni celulozni filter papir) kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze.

### **3.2.2. Određivanje fizikalnih karakteristika vodenih ekstrakata**

Nakon završe ekstrakcije, određuju se fizikalne karakteristike pripremljenih vodenih ekstrakata, prethodno ohlađenih na sobnu temperaturu.

#### **Određivanje pH**

Pomoću pH metra (Jenco 601A, SAD) su izmjerene pH vrijednosti pripremljenih vodenih ekstrakata.

#### **Vodljivost i ukupne otopljene tvari**

Električna vodljivost predstavlja sposobnost otopine da prenosi struju i u pozitivnoj je korelaciji s količinom iona u otopini. U vodenim otopinama su ukupne otopljene tvari (eng. Total Dissolved Solids – TDS) većinom prisutne kao ioni te se i one mogu mjeriti preko električne vodljivosti.

Pomoću konduktometra (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) su očitane vodljivosti te ukupne otopljene tvari pripremljenih vodenih ekstrakata.

### 3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1995).

U suhe i označene aluminijske posudice s poklopcem stavi se kvarcni pijesak (u količini dovoljnoj da prekrije dno posudice). Posudice se suše u sušioniku sa skinutim poklopcem pri temperaturi od 105 °C. Nakon sušenja koje traje sat vremena od trenutka kada je postignuta temperatura od 105 °C, poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu s točnošću  $\pm 0,0002$  g. U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom, otpipetira se volumen ekstrakta od 3 mL. Sušenje uzoraka traje 4 sata pri 105 °C u sušioniku (Inko, ST605, Hrvatska) s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbi:

$$\% \text{ vode} = (m_a - m_b) \cdot 100/m \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [2]$$

gdje su:

$m_a$  – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

$m_b$  – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

$m$  – masa uzorka (g).

### 3.2.4. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određuju se spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin-



Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 765 nm i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Lachman i sur., 1998).

U označene staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu\text{L}$  uzorka, 500  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Nakon dodatka 20 %-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pri 765 nm.

Slijepa proba se priprema na isti način kao i reakcijska smjesa, samo što umjesto uzorka sadrži 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode.

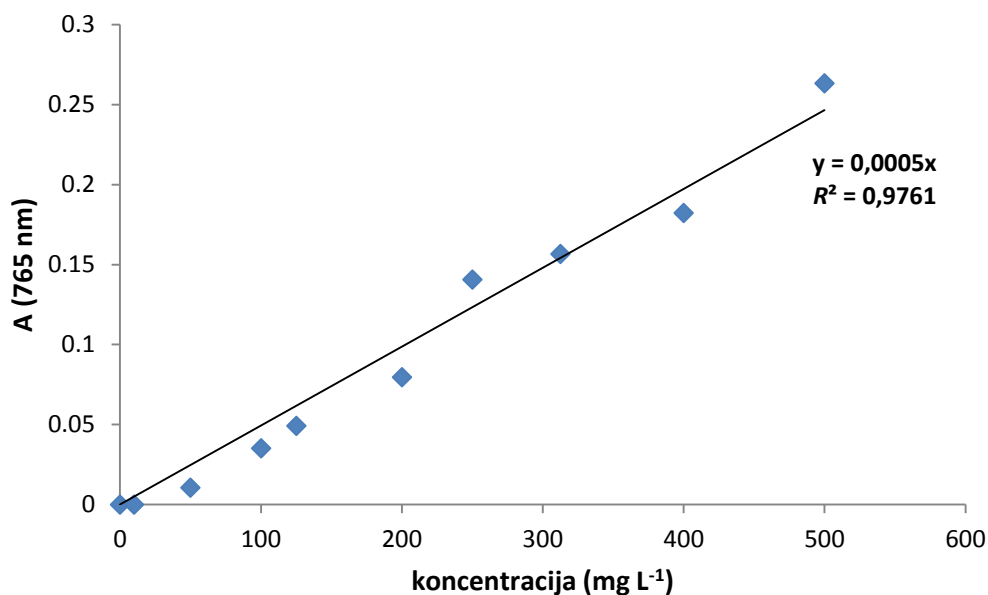
Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po litri ili gramu suhe tvari uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti polaznu otopinu galne kiseline u koncentraciji 0,5 g  $\text{L}^{-1}$ . Odvaži se 0,005 g galne kiseline u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Iz tako pripremljene otopine naprave se razrijeđenja koja odgovaraju koncentracijama otopine galne kiseline 0 – 400 mg  $\text{L}^{-1}$ .

Reakcijska smjesa umjesto vodenog ekstrakta samoniklog bilja sadrži 100  $\mu\text{L}$  otopine galne kiseline poznatih koncentracija. Za svaki uzorak pripremaju se tri paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline (mg  $\text{L}^{-1}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 3). Na osnovu dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija ukupnih polifenola.



**Slika 3.** Baždarni pravac za galnu kiselinu

Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu glasi:

$$y = 0,0005 \cdot x \quad [3]$$

gdje je:

x – koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>)

y– apsorbancija pri 765 nm

R<sup>2</sup>– koeficijent determinacije.

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

ABTS 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 12 sati prije analize. Udjel ABTS radikala koje "gase" različiti antioksidansi mjeri se 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.

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata samoniklog bilja pripremi se otopina ABTS<sup>+</sup> radikala, oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS sa 110 mM kalijevim peroksodisulfatom. Pripremljena otopina ostavi se stajati preko noći, a zatim se razrijedi etanolom (96 %) do konačne koncentracije ABTS<sup>+</sup> radikala od 1 % tako da apsorbancija te otopine iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Alikvot od 40  $\mu\text{L}$  razrijeđenih uzoraka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala te se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 734 nm nakon točno 6 minuta.

Slijepa proba se priprema na isti način kao i reakcijska smjesa, samo što umjesto uzorka sadrži 40  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola.

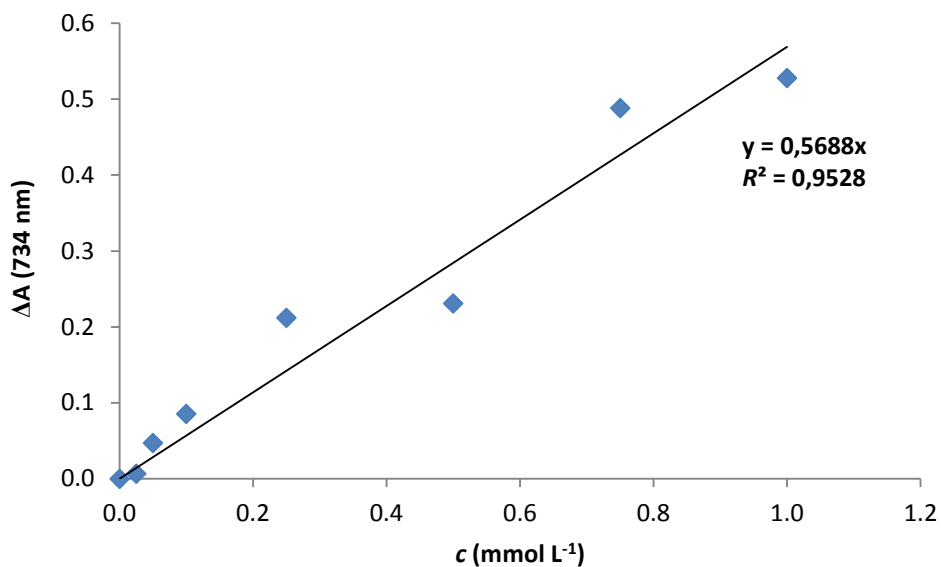
Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od slijepe probe dobiva se vrijednost  $\Delta A$ , koja se prema baždarnom pravcu za Trolox preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa) (Re i sur., 1999). Rezultati se izražavaju kao molarni ( $\text{mmol g}^{-1}$  suhe tvari) udjel ekvivalenata Trolox-a.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti polaznu otopinu 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), u koncentraciji 1  $\text{mmol L}^{-1}$ . Odvaži se 0,0025 g Troloxa u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake metanolom. Iz tako pripremljene otopine naprave se razrijeđenja koja odgovaraju koncentracijama otopine Troloxa 0 – 0,75  $\text{mmol L}^{-1}$ .

Reakcijska smjesa umjesto vodenog ekstrakta samoniklog bilja sadrži 40  $\mu\text{L}$  otopine Trolox-a poznatih koncentracija. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

Promjena apsorbancije ( $\Delta A$ ) računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka sa Trolox-om od apsorbancije slijepe probe. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija napravi se baždarni pravac pri čemu su na apscisi nanese koncentracije Troloxa ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), a na ordinati izračunate vrijednosti  $\Delta A$  (slika 4).



**Slika 4.** Baždarni pravac za Trolox

Jednadžba baždarnog pravca za Trolox glasi:

$$y = 0,5688 \cdot x \quad [4]$$

gdje je:

$x$  –ekvivalent Trolox-a (mmol L<sup>-1</sup>)

$y$  –razlikaslijepe probe i apsorbancije uzorka pri 734 nm

$R^2$ – koeficijent determinacije.

### 3.2.6. UV-VIS spektroskopija

Za snimanje UV-VIS spektra korišten je UV-spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska) sa instaliranim programom Acquire LITE. Prije samog početka snimanja spektra vodenih ekstrakata samoniklog bilja potrebno je izvršiti kalibraciju uređaja. Prilikom snimanja spektra vodenih ekstrakata potrebno je uzorak uliti u kvarcnu kivetu koja se stavlja u spektrofotometar te se klikom na Wavescan pokreće snimanje spektra. UV-VIS spektar svakog uzorka snima se dva puta, a kao rezultat se uzima jedan spektar koji predstavlja srednju vrijednost.

### 3.2.7. Obrada podataka i modeli

Dobiveni eksperimentalni podaci analizirani su primjenom deskriptivne statistike (srednje vrijednosti, standardna devijacija) korištenjem programa MS Excel 2010.

Metoda koja proučava ovisnost između varijabli i predstavlja najčešće upotrebljavanu statističku metodu je regresija, a linearna ovisnost je najjednostavnija ovisnost koja se može promatrati.

Kod multivarijatne regresije promatra se linearna ovisnost jedne zavisne varijable ( $y$ ) o više nezavisnih varijabli ( $x_1, x_2, \dots, x_n$ )

$$y_i = b + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + \dots + a_n \cdot x_n \quad [5]$$

gdje je:

$y_i$  = promatrani parametar ( $i=1$  za ukupne otopljene tvari (TDS);  $i=2$  za vodljivost;  $i=3$  za udio suhe tvari;  $i=4$  za antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom te  $i=5$  za koncentraciju ukupnih fenola)

$x_j$  = valne duljine UV spektra ( $j = 411$  do  $900$  nm).

Reprezentativnost modela prikazana je koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) koji je dobiven obradom rezultata u programu MS Excel 2010. Što je koeficijent determinacije bliži jedinici, model je reprezentativniji i odnos među promatranim varijablama se procjenjuje prema Chadockovoj ljestvici (tablica 1).

**Tablica 1.** Chadockova ljestvica

$R^2$	Značenje
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

## **Multivarijantne analize podataka**

Metode multivarijantne analize podataka su kemometrijske metode koje se primjenjuju za dobivanje informacija iz kemijskih podataka pomoću statističkih postupaka (Karande i sur., 2010).

Najčešće primjenjivane metode multivarijantne analize podataka su: analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Components Analysis*, PCA) i parcijalni najmanji kvadrati (engl. *Partial Least Squares*, PLS).

### **Analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Components Analysis*, PCA)**

Analiza glavnih komponenti omogućuje analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizikalnog ili kemijskog procesa. Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u  $n$ -dimenzijskom prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu  $x_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ). Uvođenjem glavnih komponenti (engl. *Principal Components*, PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavnjuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3,...). Vizualizacija podataka se često izvodi pomoću tzv. faktorskih bodova (eng. *score plots*). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućuje i njihovo grupiranje (Jednačak i Novak, 2013).

### **Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Squares*, PLS)**

Metodom parcijalne regresije najmanjih kvadrata mogu se analizirati podaci unatoč malim razlikama u spektrima. Za razliku od PCA, podaci se PLS metodom opisuju pomoću fizičkog modela u kojemu broj varijabli treba biti što je moguće manji. U PCA metodi su glavne komponente određene samo varijancom mjerenih varijabli i neovisne su o njihovom slaganju s traženim svojstvom, dok se u PLS modelu latentne varijable odabiru tako da se dobije najbolja slaganja ispitivanih svojstava i mjerene varijable. Svrha analize PLS je opisati odnos između objekata u  $x$ -prostoru i njihovog položaja u odgovarajućem  $y$ -prostoru uz minimalna odstupanja (Jednačak i Novak, 2013).

Statističke metode olakšavaju interpretaciju dobivenih podataka i optimiranje procesnih parametara.

U ovom radu primijenjena je metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (tzv. PLS regresija) i analiza glavnih komponenti (tzv. PCA analiza) u programu XLStat (MS Excel 2010).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U cilju istraživanja fizikalnih i kemijskih karakteristika biljnih ekstrakata lavande i melise i njihove međusobne povezanosti kao i povezanosti s UV-VIS spektroskopijom, prikazani su rezultati koji slijede.

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz biljnog materijala provedena je pri 40 °C, 60 °C i 80 °C korištenjem vode kao otapala, u određenim vremenskim intervalima (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 70; 80; 90 min) pri brzini miješanja 500 okretaja u minuti.

Prilikom istraživanja određivane su fizikalne (pH, vodljivost, ukupne otopljene tvari i suha tvar) i kemijske (ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet) karakteristike vodenih ekstrakata lavande i melise. Grafički su prikazane ovisnosti ukupnih otopljenih tvari, vodljivosti i suhe tvari o vremenu ekstrakcije, pri različitim temperaturama (slike 5–10) dok su pH vrijednosti vodenih ekstrakata prikazane tablicama 2 i 3.

Ukupni polifenoli određivani su spektrofotometrijski, Folin-Ciocalteu metodom, te su dobiveni rezultati prikazani na slikama 11 i 12. Antioksidacijski kapacitet je određen primjenom ABTS metode, te su dobiveni rezultati prikazani tablicama 4 i 5.

Različiti trendovi odnosa ukupnih polifenola vs. ukupne otopljene tvari i ukupnih polifenola vs. vodljivost pri različitim temperaturama ekstrakcije, prikazani su slikama 13–16, uz prikaz linearnih regresijskih modela i koeficijenata determinacije ( $R^2$ ).

PCA (eng. Principal Component Analysis) metoda je korištena za prikaz sličnosti i različitosti uzoraka vodenih ekstrakata lavande i melise, ovisno o mjerenim parametrima (ukupni polifenoli i antioksidacijski kapacitet). Rezultati PCA analize prikazani su na slici 17.

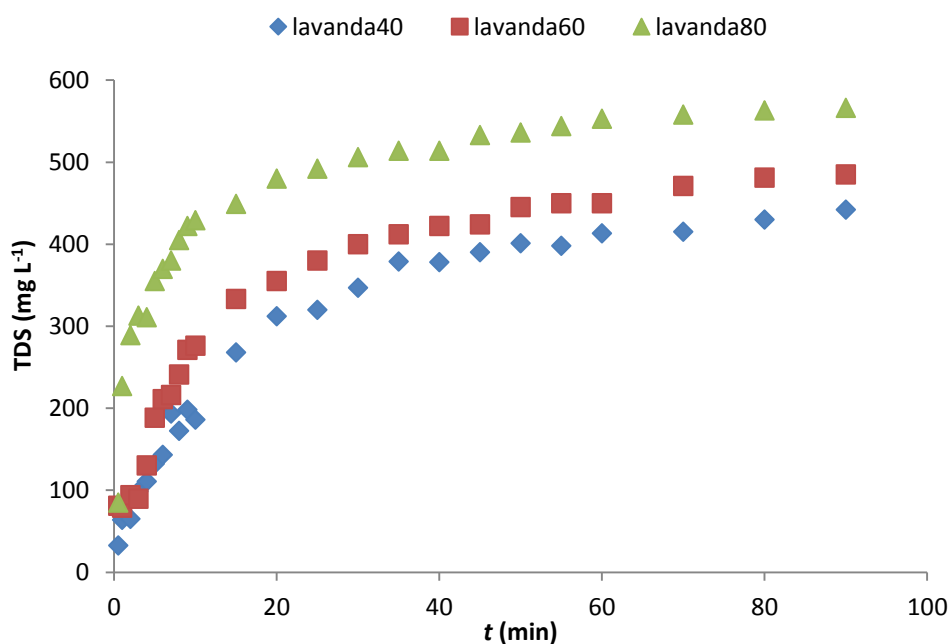
Na samom kraju je prikaz rezultata primjene PLS (eng. Partial Least Squares) regresije dobivenog primjenom UV spektara u odnosu na fizikalno-kemijske (vrijeme ekstrakcije, ukupne otopljene tvari, vodljivost, suha tvar, ukupni polifenoli, antioksidacijski kapacitet) karakteristike pri različitim temperaturama ekstrakcije (tablica 6). Slike 18 i 19 prikazuju UV spektar vodenih ekstrakata lavande i melise dok slike 20–24 pokazuju usklađenost eksperimentalnih podataka sa vrijednostima dobivenih na osnovu PLS modela, uzimajući u obzir UV spektar.



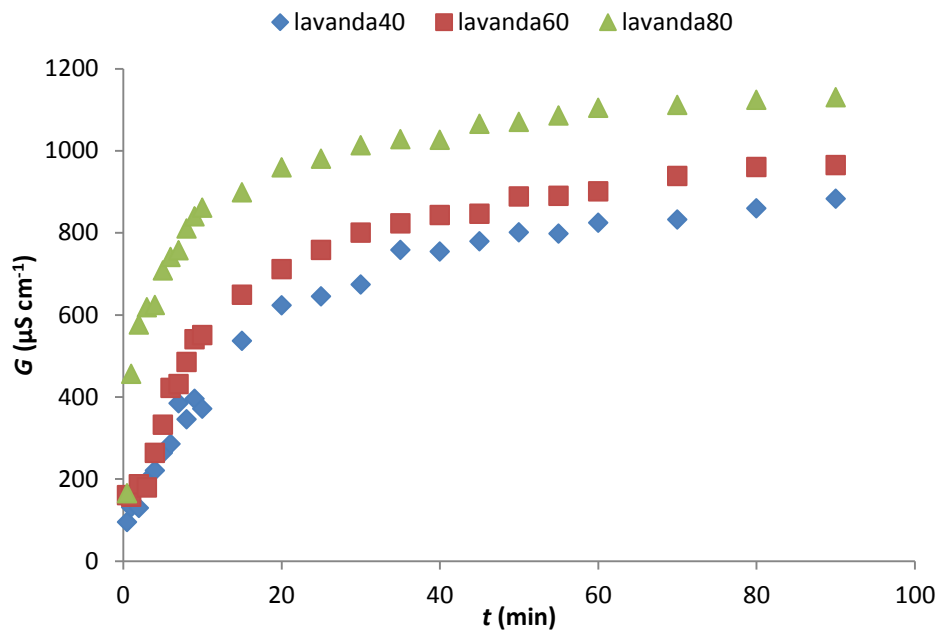
#### 4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA FIZIKALNIH KARAKTERISTIKA VODENIH EKSTRAKATA LAVANDE I MELISE

Određivanjem fizikalnih karakteristika kao što su ukupne otopljene tvari (eng. Total Dissolved Solids, TDS/ $\text{mg L}^{-1}$ ), vodljivost ( $G/\mu\text{S cm}^{-1}$ ), suha tvar (%) te pH vrijednost pri različitim temperaturama ekstrakcije (40 °C, 60 °C i 80 °C) promatrane su sličnosti i razlike u svojstvima istraživanih biljnih ekstrakata.

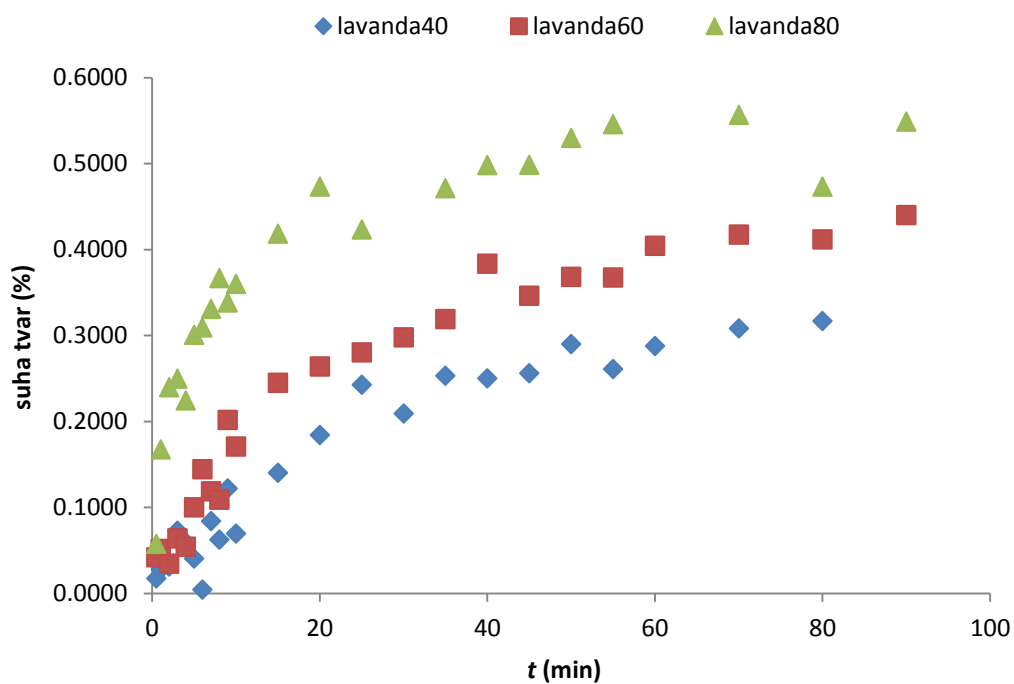
Slike 5–10 prikazuju grafički prikaz ovisnosti TDS-a, vodljivosti ( $G$ ) i suhe tvari o vremenu ekstrakcije za vodene ekstrakte lavande i melise pri različitim temperaturama.



**Slika 5.** Grafički prikaz ovisnosti TDS-a o vremenu ekstrakcije za lavandu pri 40 °C, 60 °C i 80 °C

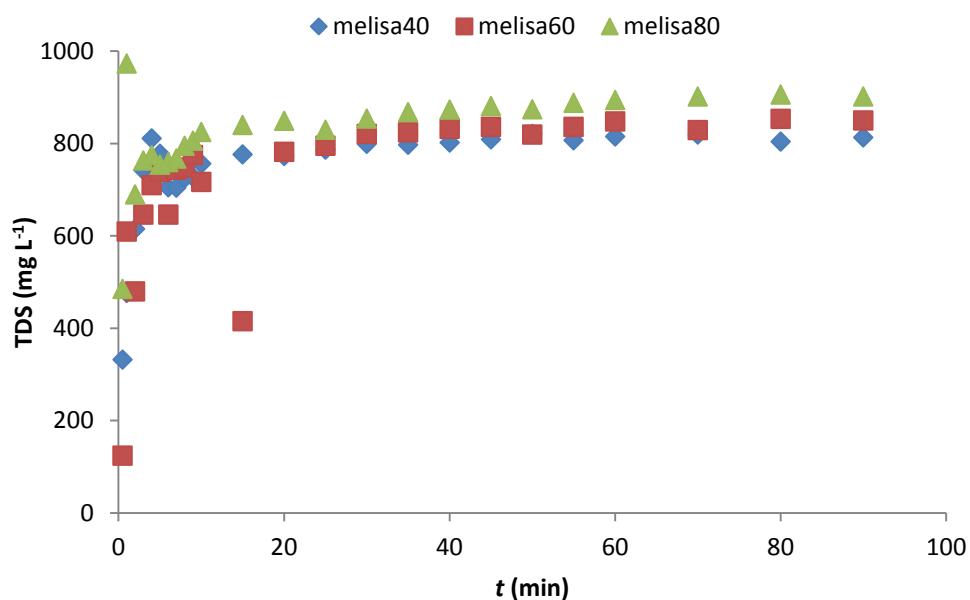


**Slika 6.** Grafički prikaz ovisnosti vodljivosti ( $G$ ) o vremenu ekstrakcije za lavandu pri 40 °C, 60 °C i 80 °C

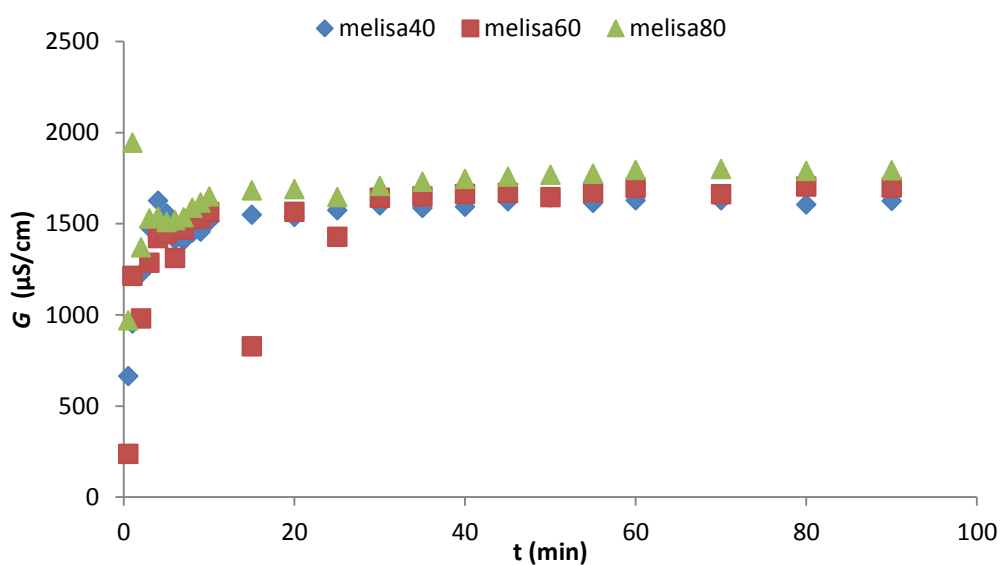


**Slika 7.** Grafički prikaz ovisnosti suhe tvari (%) o vremenu ekstrakcije za lavandu pri 40 °C, 60 °C i 80 °C

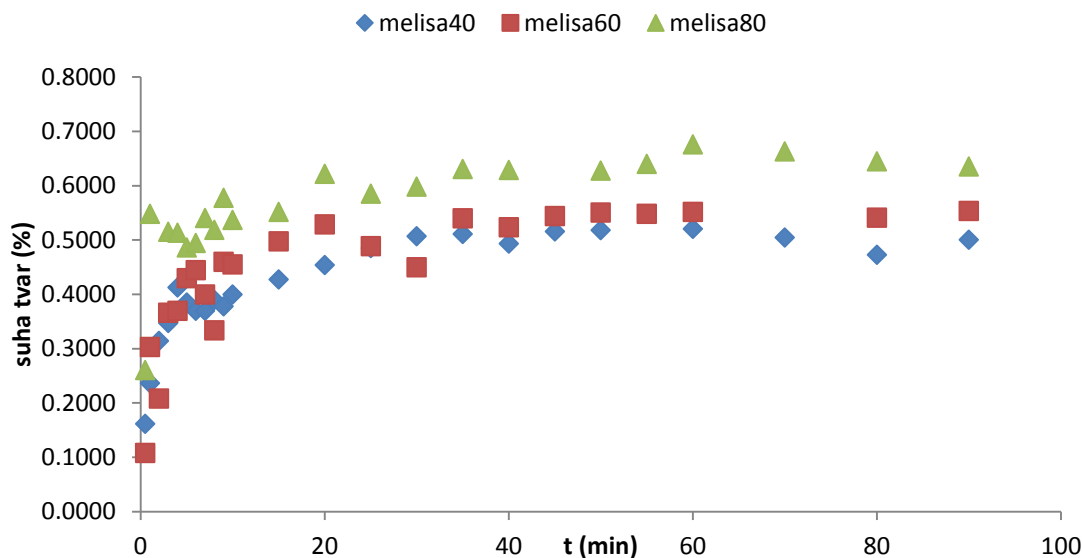
Iz slika 5–7 vidljiv je jasan trend koji govori kako porastom temperature i produženjem vremena ekstrakcije, TDS (slika 5), vodljivost (slika 6) te udio suhe tvari (slika 7) u vodenim ekstraktima lavande raste.



**Slika 8.** Grafički prikaz ovisnosti TDS-a o vremenu ekstrakcije za melisu pri 40 °C, 60 °C i 80 °C



**Slika 9.** Grafički prikaz ovisnosti vodljivosti (G) o vremenu ekstrakcije za melisu pri 40 °C, 60 °C i 80 °C



**Slika 10.** Grafički prikaz ovisnosti suhe tvari o vremenu ekstrakcije za melisu pri 40 °C, 60 °C i 80 °C

Iz slika 8–10 vidi se kako vrijednosti TDS-a, vodljivosti i udjela suhe tvari u vodenim ekstraktima melise rastu porastom temperature ekstrakcije. Što se tiče vremena ekstrakcije, trend porasta vrijednosti TDS-a, vodljivosti i udjela suhe tvari je značajan tijekom prvih 20 minuta ekstrakcije nakon kojih više nema neke značajnije razlike.

Kada se usporede vrijednosti TDS-a, vodljivosti i udjela suhe tvari melise sa istim tim vrijednostima kod lavande, vidljivo je da lavanda ima niže vrijednosti od melise. Prema dobivenim podacima čini se kako se u vodenom ekstraktu lavande nalazi manja količina ukupnih otopljenih tvari, odnosno ima više tvari koje isparavaju pod određenim uvjetima što bi značilo da lavanda u svom sastavu ima veći sadržaj ulja nego vodeni ekstrakt melise.

Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata (tablice 2 i 3) može se zaključiti kako pH vrijednosti za vodeni ekstrakt lavande (tablica 2) i melise (tablica 3) nemaju neki značajniji trend, odnosno pH vrijednosti u prvim minutama ekstrakcije počinju rasti i nakon toga padati te su nakon 10 minuta konstantne. Najniže pH vrijednosti vodenih ekstrakata lavande i melise dobivene su pri 80 °C dok su najviše pH vrijednosti postignute na samom početku ekstrakcije (0,5 min) i temperaturi 60 °C (tablice 2 i 3).

**Tablica 2.** pH vrijednosti za vodeni ekstrakt lavande (40 °C, 60 °C i 80 °C), pri različitim vremenima ekstrakcije

<i>t/min</i>	pH (40 °C)	pH (60 °C)	pH (80 °C)
0,5	5,92	5,94	5,92
1	6,01	6,1	5,52
2	6,16	6,16	5,29
3	6,37	6,22	5,43
4	6,52	6,37	5,28
5	6,21	6,26	5,25
6	6,1	6,16	5,24
7	5,89	6,06	5,25
8	5,88	5,98	5,27
9	5,97	5,92	5,26
10	5,9	5,84	5,24
15	5,75	5,78	5,18
20	5,61	5,78	5,21
25	5,64	5,7	5,17
30	5,55	5,61	5,16
35	5,56	5,56	5,14
40	5,49	5,54	5,11
45	5,52	5,49	5,18
50	5,49	5,46	5,07
55	5,52	5,44	5,1
60	5,53	5,43	5,08
70	5,46	5,42	5,06
80	5,42	5,41	5,03
90	5,39	5,39	5,04

**Tablica 3.** pH vrijednosti za vodeni ekstraktmelise (40 °C,60 °C i 80 °C), pri različitim vremenima ekstrakcije

<b>t/min</b>	<b>pH (40 °C)</b>	<b>pH (60 °C)</b>	<b>pH (80 °C)</b>
0,5	6,3	6,38	6,36
1	6,29	6,32	6,03
2	6,29	6,31	6,06
3	6,26	6,23	6,15
4	6,23	6,2	6,08
5	6,21	6,22	6,08
6	6,26	6,2	6,06
7	6,29	6,24	6,1
8	6,25	6,19	6,1
9	6,22	6,2	6,09
10	6,22	6,17	6,04
15	6,19	6,15	6,03
20	6,2	6,21	6,09
25	6,2	6,21	6,19
30	6,18	6,25	6,06
35	6,22	6,19	6,01
40	6,3	6,12	6,03
45	6,26	6,13	6,05
50	6,22	6,2	6,05
55	6,26	6,22	5,99
60	6,23	6,16	5,98
70	6,19	6,14	5,95
80	6,28	6,17	5,97
90	6,28	6,11	5,99

## **4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VODENIH EKSTRAKATA LAVANDE I MELISE**

Udio ukupnih polifenola (UF) u vodenim ekstraktima istraživanih biljaka određen je spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Lachman i sur., 1998). Na slikama 11. i 12. prikazane su ovisnosti masenih koncentracija UF o vremenu ekstrakcije za vodene ekstrakte lavande i melise, pri različitim temperaturama. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka (mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari).

Na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata vidljivo je da vodeni ekstrakti melise sadrže značajno veći udio ukupnih polifenola (slika 12) u odnosu na vodene ekstrakte lavande (slika 11). Lavanda u svom sastavu sadrži 1–3% ulja (kvercetin, apigenin, ružmarinska kiselina, 1, 8-cineol) dok melisa sadrži svega 0,1 % ulja, a od aktivnih sastojaka sadrži geraniol, eugenol te fenolne kiseline (ružmarinska kiselina, kafeinska kiselina, protokatehinska kiselina) (Wu i sur., 2004). Lavanda zbog većeg sadržaja ulja brže i lakše ispari, stoga melisa ima veći udio ukupnih polifenola.

Također je vidljivo da porastom temperature raste udio ukupnih polifenola u ekstraktima istraživanih biljaka. Najveći udio UF za ekstrakt melise iznosi 183,69 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 80°C dok najmanji udio UF iznosi 133,63 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 40 °C (slika 12). Što se ekstrakata lavande tiče, najveći udio UF iznosi 81,84 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 80°C dok je najmanji udio UF (35,85 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari) dobiven pri temperaturi 40 °C (slika 11).

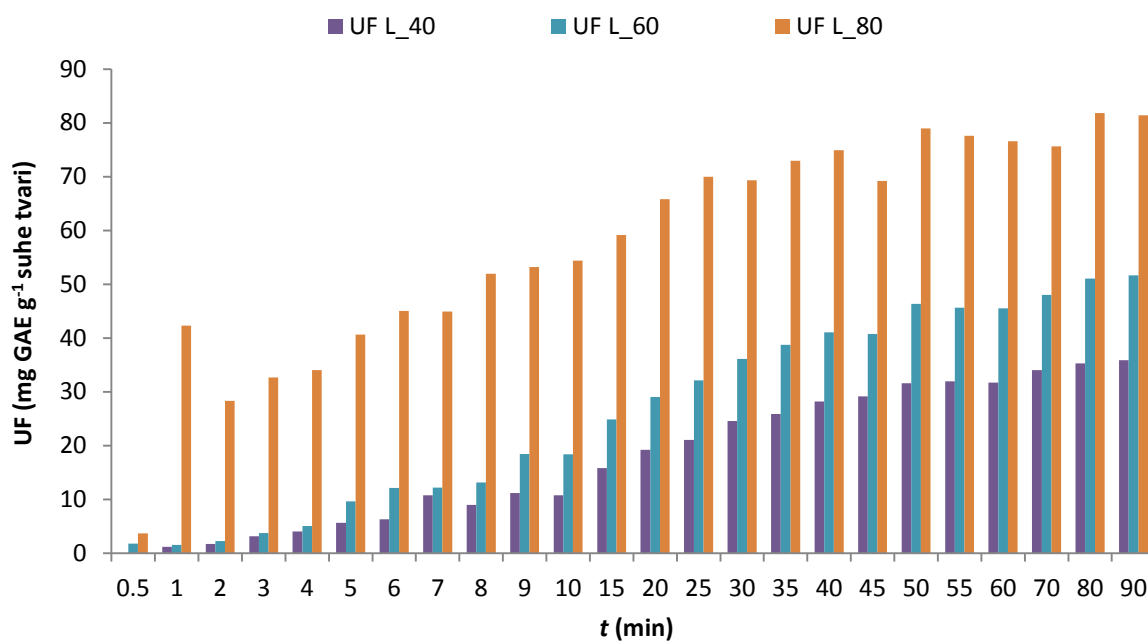
Vezano za vrijeme trajanja ekstrakcije, dobiveni rezultati pokazuju da je utjecaj vremena ekstrakcije istovremeno u funkciji temperature pa su tako pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C dobiveni veći udjeli ukupnih polifenola nakon 90 minuta ekstrakcije, u odnosu na početne minute. Može se zaključiti što je vrijeme ekstrakcije duže, udjeli ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima istraživanih biljaka su veći (slika 11, slika 12).

Dobiveni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima (Jokić i sur., 2010; Jurinjak Tušek i sur., 2016).

Jokić i suradnici (2010) su u svom istraživanju pratili utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na udio ukupnih polifenola iz mljevene soje sorte Ika. Najveći udio ukupnih

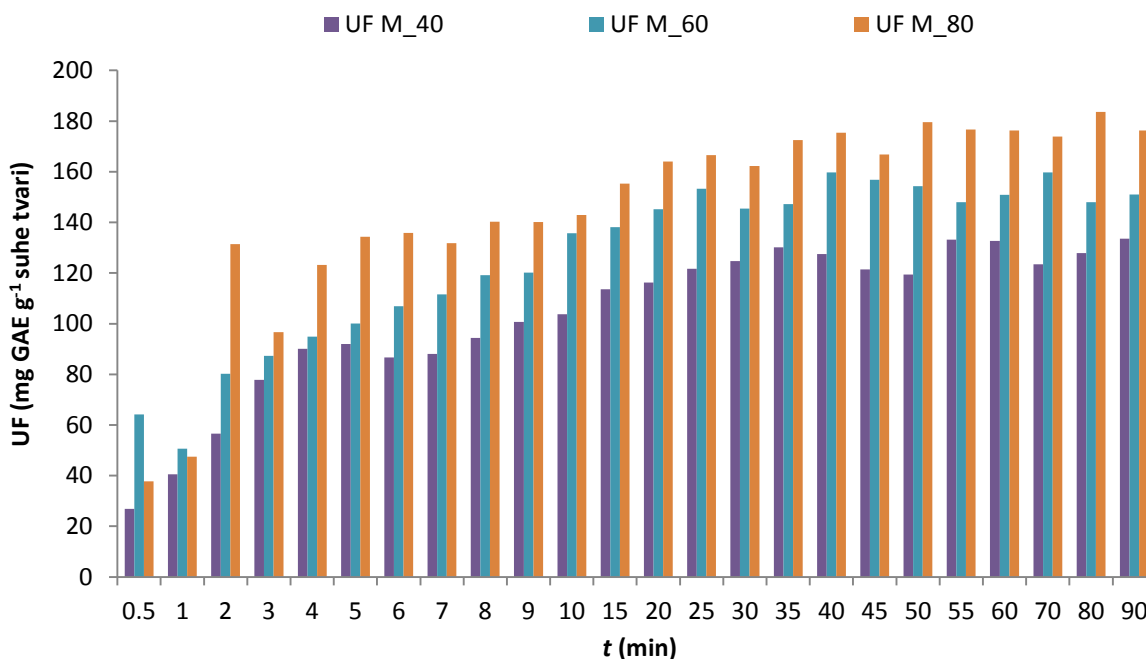
polifenola u ekstraktima soje dobiven je pri 80 °C (4,322 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari) i vremenu ekstrakcije 120 minuta, ovisno o otapalu.

Jurinjak Tušek i suradnici (2016) također su ispitali utjecaj temperature i vremena ekstrakcije u vodenim ekstraktima kamilice, stolisnika, nevena i maslačka, biljkama koje pripadaju porodici *Asteraceae*. Rezultati su pokazali kako porastom temperature (40 °C, 60°C i 80 °C) raste udio ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima istraživanih biljaka te se veći udio ukupnih polifenola i bioaktivnih komponenata oslobađa iz biljnog materijala u otapalo tijekom prvih 10 minuta procesa ekstrakcije.



**Slika 11.** Grafički prikaz ovisnosti ukupnih polifenola (UF) o vremenu ekstrakcije za lavandu (L) pri 40 °C, 60 °C i 80 °C





**Slika 12.** Grafički prikaz ovisnosti ukupnih polifenola (UF) o vremenu ekstrakcije za melisu (M) pri 40 °C, 60 °C i 80 °C

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata istraživanih biljaka ABTS metodom kojom se određuje sposobnost gašenja slobodnih ABTS radikala prikazani su tablicama 4 i 5. Rezultati su izraženi kao molarni udio ekvivalenata Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka ( $\text{mmol Trolox g}^{-1}$  suhe tvari).

Najniža antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta lavande iznosi  $0,193 \text{ mmol Trolox g}^{-1}$  suhe tvari pri 80 °C (20 min), dok najviša antioksidacijska aktivnost iznosi  $0,394 \text{ mmol Trolox g}^{-1}$  suhe tvari pri temperaturi ekstrakcije 60 °C (8 min) (tablica 4). Najniža antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta melise iznosi  $0,105 \text{ mmol Trolox g}^{-1}$  suhe tvari pri 80 °C (5 min), dok najviša antioksidacijska aktivnost iznosi  $0,376 \text{ mmol Trolox g}^{-1}$  suhe tvari pri temperaturi ekstrakcije 40 °C (0,5 min) (tablica 5). Tablice 4 i 5 jasno prikazuju kako antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata istraživanih biljaka ne pokazuje trend porasta u odnosu na temperaturu i vrijeme trajanja ekstrakcije, niti prati trend porasta UF (slike 11 i 12) te je očigledno kako bi, za antioksidacijsku aktivnost biljaka koje su istraživane u ovom radu, bilo bolje primijeniti neku drugu metodu.

**Tablica 4.** Srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata lavande mjerene pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C te različitim vremenima ekstrakcije (rezultati su prikazani u obliku: srednja vrijednost ± standardna devijacija)

<b>ABTS/mmol Trolox g<sup>-1</sup> suhe tvari</b>			
<b>t/min</b>	<b>40 °C</b>	<b>60 °C</b>	<b>80 °C</b>
0,5	0,216±0,054	0,327±0,003	0,317±0,003
1	0,306±0,017	0,330±0,017	0,338±0,011
2	0,267±0,018	0,352±0,044	0,292±0,027
3	0,289±0,003	0,301±0,008	0,325±0,025
4	0,303±0,016	0,293±0,004	0,263±0,007
5	0,303±0,017	0,251±0,039	0,269±0,025
6	0,358±0,038	0,306±0,022	0,290±0,003
7	0,304±0,008	0,338±0,039	0,264±0,046
8	0,271±0,018	0,394±0,068	0,285±0,006
9	0,259±0,014	0,310±0,069	0,252±0,010
10	0,300±0,018	0,303±0,006	0,247±0,004
15	0,297±0,011	0,292±0,005	0,237±0,014
20	0,263±0,025	0,305±0,001	0,193±0,020
25	0,284±0,007	0,263±0,001	0,239±0,000
30	0,258±0,001	0,320±0,032	0,230±0,039
35	0,253±0,015	0,299±0,001	0,222±0,005
40	0,312±0,003	0,301±0,024	0,255±0,059
45	0,271±0,053	0,312±0,020	0,211±0,003
50	0,288±0,020	0,276±0,028	0,224±0,004
55	0,259±0,008	0,235±0,013	0,205±0,005
60	0,293±0,028	0,237±0,004	0,220±0,001
70	0,281±0,016	0,253±0,053	/*
80	0,269±0,003	0,263±0,039	/*
90	0,262±0,003	0,245±0,017	0,085±0,014

\*nd (nije detektirano)

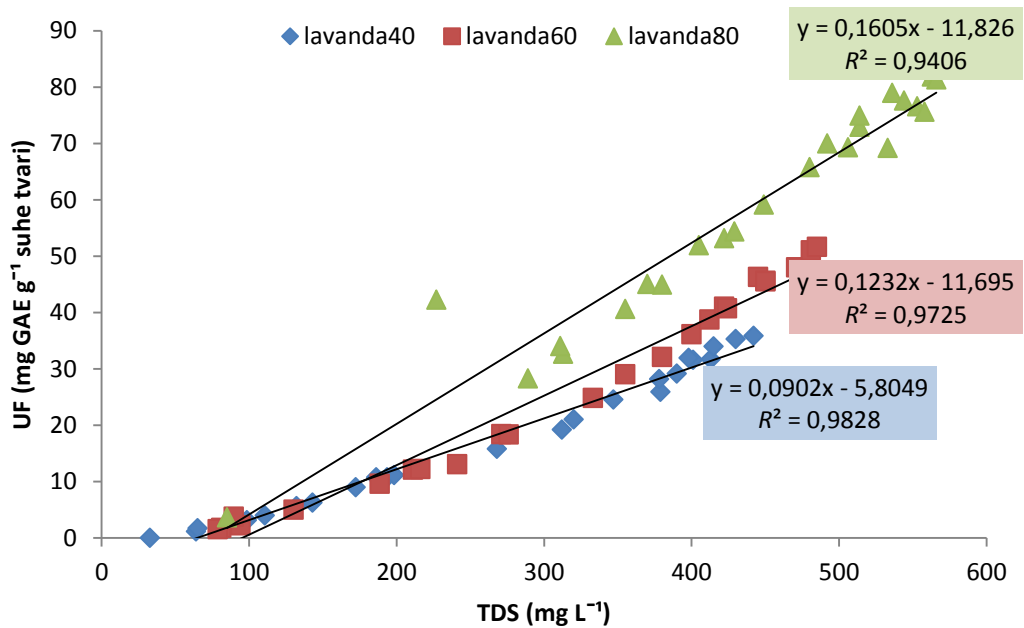
**Tablica 5.** Srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata melise mjerene pri temperaturama 40 °C, 60°C i 80°C te različitim vremenima ekstrakcije (rezultati su prikazani u obliku: srednja vrijednost ± standardna devijacija)

<b>ABTS/mmol Trolox g<sup>-1</sup> suhe tvari</b>			
<b>t/min</b>	<b>40 °C</b>	<b>60 °C</b>	<b>80 °C</b>
0,5	0,376±0,010	0,356±0,011	0,193±0,049
1	0,348±0,016	0,328±0,007	0,151±0,004
2	0,269±0,010	0,333±0,004	0,222±0,082
3	0,291±0,034	0,341±0,007	0,165±0,001
4	0,286±0,007	0,352±0,022	0,131±0,011
5	0,332±0,001	0,235±0,021	0,105±0,038
6	0,283±0,029	0,301±0,007	0,224±0,072
7	0,297±0,021	0,280±0,043	0,199±0,053
8	0,285±0,012	0,227±0,004	0,134±0,016
9	0,279±0,021	0,290±0,020	0,149±0,015
10	0,293±0,008	0,212±0,009	0,154±0,032
15	0,278±0,022	0,258±0,035	0,107±0,016
20	0,253±0,004	0,233±0,023	0,121±0,010
25	0,269±0,021	0,202±0,006	/*
30	0,197±0,026	0,204±0,016	/*
35	0,296±0,111	0,222±0,012	/*
40	0,256±0,037	0,250±0,004	/*
45	0,194±0,026	0,212±0,026	/*
50	0,250±0,042	0,201±0,041	/*
55	0,235±0,020	0,170±0,004	/*
60	0,227±0,025	0,128±0,037	/*
70	0,196±0,013	0,136±0,005	/*
80	0,219±0,041	0,158±0,022	/*
90	0,223±0,070	0,245±0,015	0,022±0,042

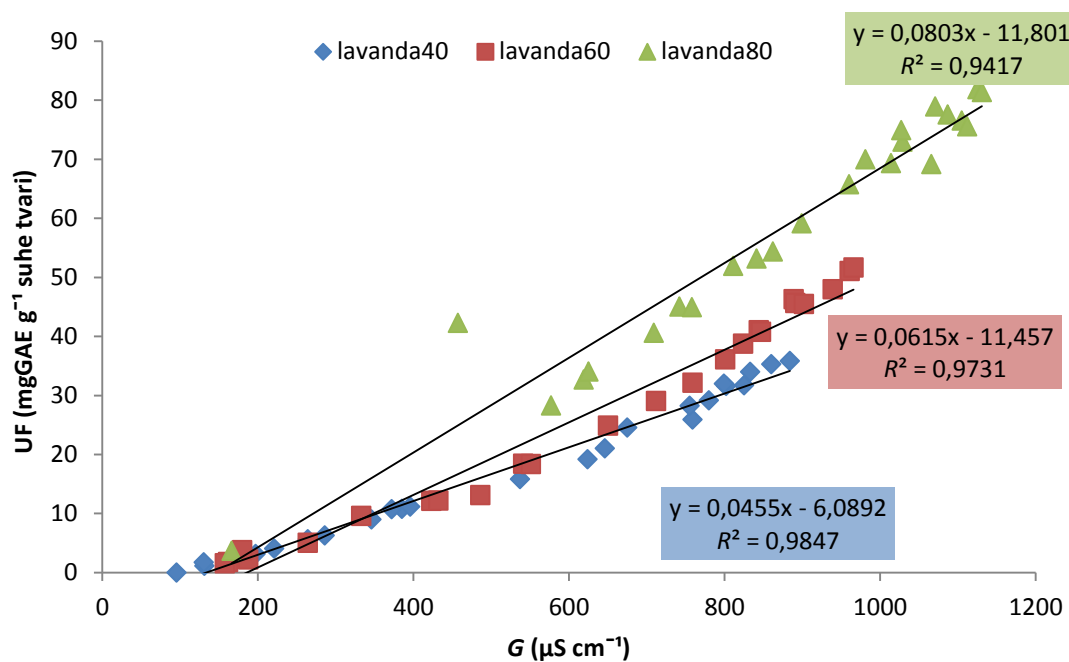
\*nd (nije detektirano)

### 4.3. REGRESIJSKI MODELI ODNOSA PROMATRANIH PARAMETARA

Za analizu korelacija između fizikalnih (TDS,  $G$ ) i kemijskih (UF) svojstava vodenih ekstrakata lavande i melise, pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C, korišteni su jednostavni linearni regresijski modeli.

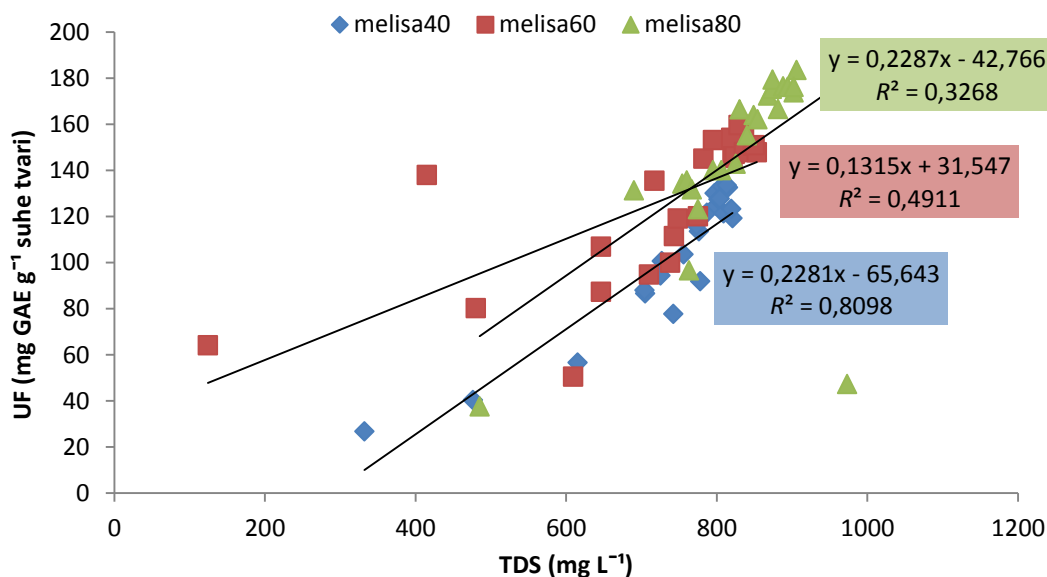


Slika 13. Linearna korelacija između TDS-a i UF za vodeni ekstrakt lavande

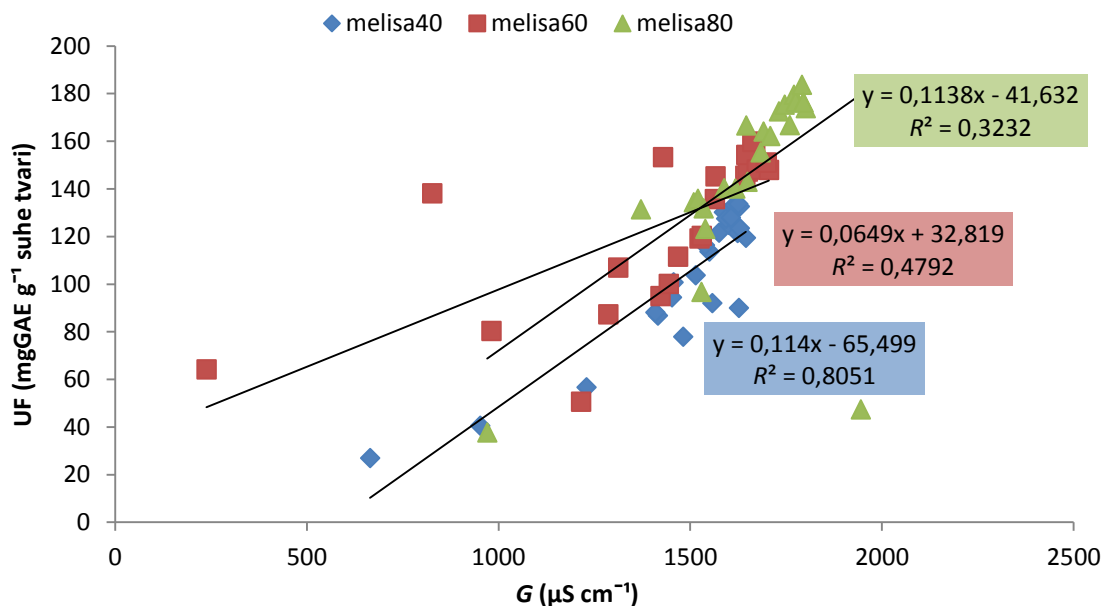


Slika 14. Linearna korelacija između  $G$  i UF za vodeni ekstrakt lavande

Što se tiče vodenog ekstrakta lavande, vidljiva je čvrsta veza između UF i TDS-a (slika 13) i udjela UF i  $G$  (slika 14) pri danim temperaturama. Koeficijent determinacije u prvom i drugom slučaju je jako visok ( $R^2 > 0,94$ ) (slike 13 i 14). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da postoji pozitivna korelacija između UF i TDS-a, te UF i  $G$ , te je najčvršća veza između promatranih parametara postignuta pri temperaturi ekstrakcije 40 °C ( $R^2 = 0,98$ ).



**Slika 15.** Linearna korelacija između TDS-a i UF za vodeni ekstrakt melise



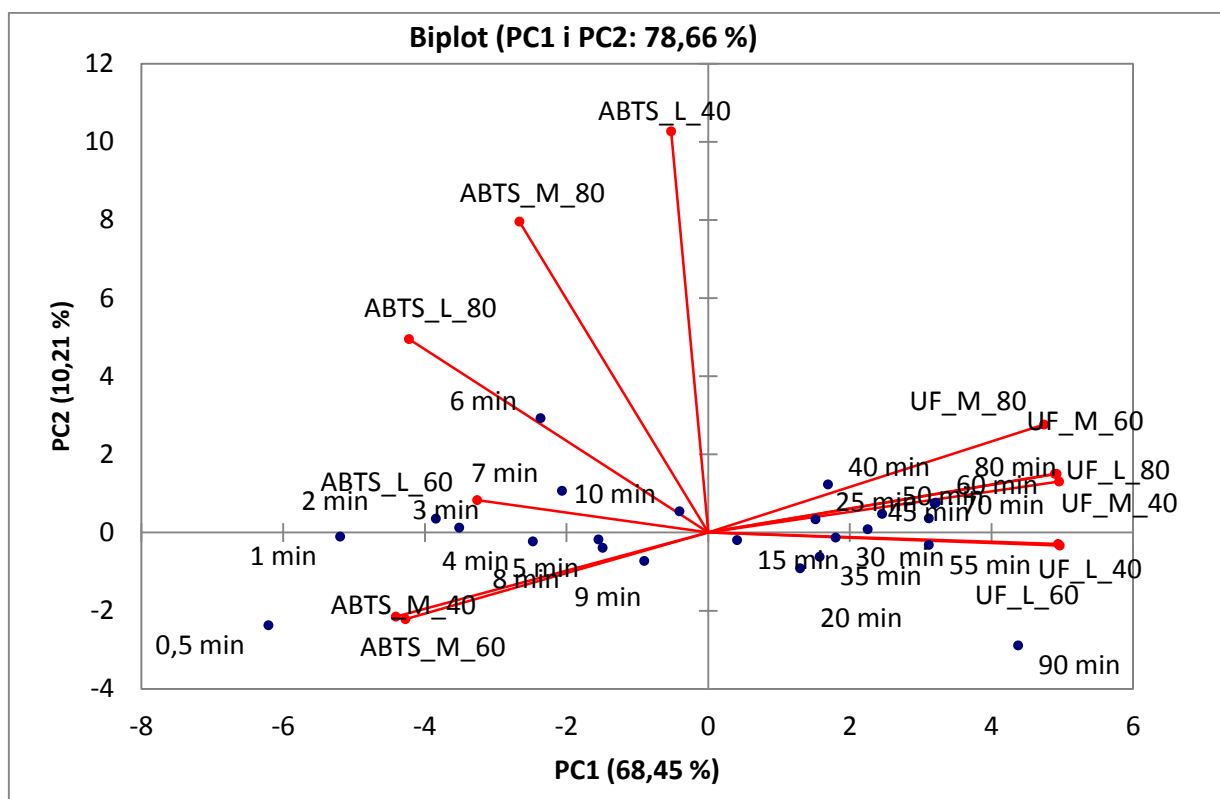
**Slika 16.** Linearna korelacija između  $G$  i UF za vodeni ekstrakt melise

Što se vodenog ekstrakta melise tiče, vidljiva je čvrsta veza između UF i TDS-a te UF i  $G$  pri temperaturi ekstrakcije 40 °C ( $R^2 = 0,81$ ) (slike 15 i 16). Porastom temperature ekstrakcije veza između UF i TDS-a te UF i  $G$  slabi ( $R^2 > 0,48$ ), da bi pri 80 °C koeficijent determinacije iznosio 0,32 u oba slučaja (slike 15 i 16) što znači da vezu između UF i TDS-a te UF i  $G$  možemo okarakterizirati kao vezom srednje jakosti (tablica 1). Na temelju dobivenih vrijednosti najčvršća veza između promatranih parametara postignuta je pri temperaturi ekstrakcije 40 °C, pri čemu  $R^2$  iznosi 0,81.

#### **4.4. ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI (eng. Principal Component Analysis, PCA)**

U ovom radu korištena je PCA (eng. Principal Component Analysis) metoda za prikaz sličnosti i različitosti uzoraka vodenih ekstrakata istraživanih biljaka, ovisno o mjerenim parametrima (vrijeme ekstrakcije, ukupni polifenoli i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom). Analiza glavnih komponenti omogućuje analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se i za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizikalnog ili kemijskog procesa. Na slici 17 može se vidjeti da je došlo do razdvajanja uzoraka vodenih ekstrakata lavande i melise koji su se rasporedili u sva četiri kvadranta. Antioksidacijske aktivnosti za lavandu 40 °C, 60 °C i 80 °C te melisu 80 °C smjestile su se u drugom kvadrantu što je pokazatelj njihove najviše antioksidacijske aktivnosti (lavanda 40 °C ima i najveći ABTS). Antioksidacijske aktivnosti za melisu 40 °C i 60 °C smjestile su se u trećem kvadrantu što je ujedno pokazatelj njihove najniže antioksidacijske aktivnosti (melisa 60 °C ima najniži ABTS).

Vrijednosti udjela UF za melisu 40 °C, 60 °C, 80 °C te vrijednosti udjela UF za lavandu 80°C smjestile su se u trećem kvadrantu što je ujedno pokazatelj njihovih najvećih vrijednosti udjela ukupnih fenola ( melisa 80 °C ima najveći udio UF). Vrijednosti udjela UF za lavandu 40 °C i 60°C smjestile su se u četvrtom kvadrantu što je ujedno pokazatelj njihove najniže vrijednosti udjela UF (lavanda 60 °C ima najnižu vrijednost udjela UF).

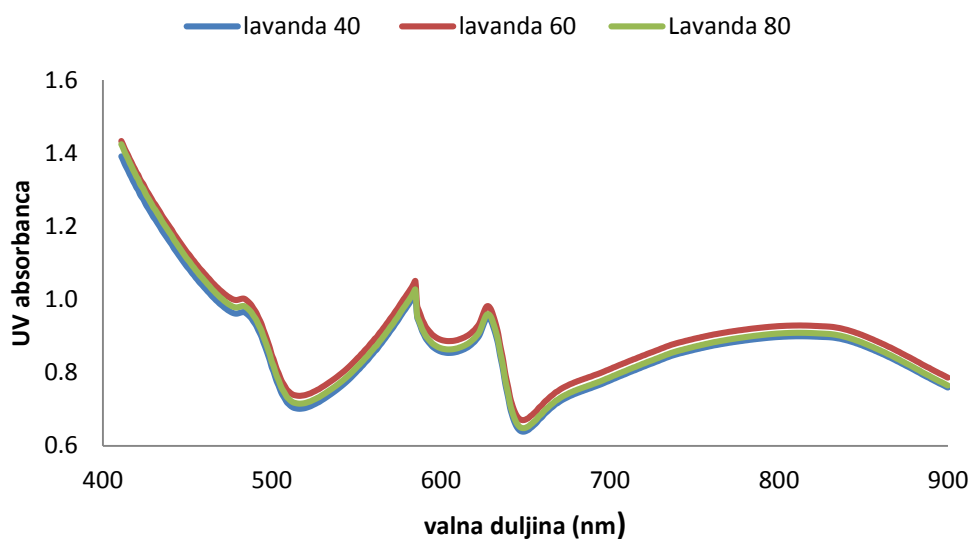


**Slika 17.** Združeni prikaz (biplot) grupiranja promatranih parametara u različito vrijeme uzorkovanja, a predstavlja rezultat PCA analize

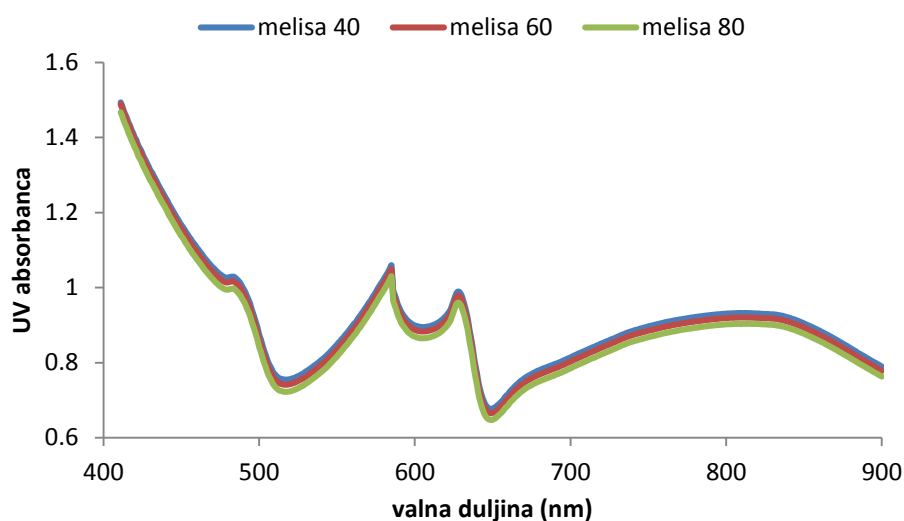
Primjenom PCA analize možemo odrediti koji od promatranih parametara imaju značajan utjecaj na raspodjelu uzoraka te na osnovu dobivenih podataka u prvoj glavnoj komponenti, koja objašnjava 68,45 % svih interakcija u promatranom skupu podataka, glavni utjecaj pripada udjelu ukupnih polifenola. Druga glavna komponenta doprinosi sa 10,21 % pojašnjenju varijanci u promatranom skupu podataka, a tu dominira vrijednost ABTS-a. Ukupno se može pojasniti preko 78,66 % varijance u promatranom skupu podataka (PC1+PC2=78,66 %). Kako su ukupni polifenoli pokazali visok utjecaj u prvoj glavnoj komponenti – upravo je njihov sadržaj koreliran sa UV spektrima kako bi se na osnovu UV spektra, mogla predvidjeti koncentracija ukupnih polifenola u vodenom ekstraktu melise i lavande.

#### 4.5. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA

Na vodenim ekstraktima istraživanih biljaka provedena je UV-VIS spektroskopija. Na slikama 18 i 19 prikazani su UV spektri vodenih ekstrakata lavande i melise. U uzorcima vodenog ekstrakta melise i lavande mjeren je UV spektar, valne duljine od 411-900 nm. Vrijednosti koje su dobivene za lavandu 40 °C, 60 °C, 80 °C (slika 18) i vrijednosti UV spektra za vodene ekstrakte melise 40 °C, 60 °C, 80 °C (slika 19) se preklapaju. Prisutna su tri pika, prvi kod valne duljine 510 nm, drugi u području 600 nm, i treći u području oko 650 nm (slika 18, slika 19).



**Slika 18.** Prikaz UV spektra vodenog ekstrakta lavande (40 °C, 60 °C, 80 °C)



**Slika 19.** Prikaz UV spektra vodenog ekstrakta melise (40 °C, 60 °C, 80 °C)



#### 4.5.2. Primjena parcijalne regresije metodom najmanjih kvadrata u promatranju odnosa UV spektara i fizikalno-kemijskih karakteristika vodenih ekstrakata lavande i melise

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata tzv. PLS model predstavlja model u kojem su ulazne varijable valne duljine UV spektara dok izlazne veličine predstavljaju ukupne otopljene tvari, vodljivost, suha tvar, ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata istraživanih biljaka.

Za sve modele su izračunati koeficijent determinacije ( $R^2$ ) i korelacije ( $R$ ) (tablica 6). Na slikama 20–24 grafički su prikazani rezultati primjene PLS regresije u predikciji fizikalno-kemijskih parametara uz interval pouzdanosti 95 %, za ekstrakciju lavande i melise pri 40 °C, 60 °C, 80 °C.

Koeficijent determinacije predstavlja kvadrat koeficijenta korelacije i pokazuje postotak varijacije za  $y$  koji je objašnjen sa svim  $x$  varijablama zajedno. Što je viša vrijednost, to je bolje slaganje između promatrane zavisne i nezavisne varijable te je njegova vrijednost uvijek između 0 i 1. Koeficijent determinacije nikada ne može biti negativan – jer je kvadratna vrijednost koeficijenta korelacije.

**Tablica 6.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) za PLS regresijske modele, za različite parametre ekstrakata biljaka lavande i melise, provedenih pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C)

Parametar	Lavanda			Melisa		
	$R^2_{40^\circ\text{C}}$	$R^2_{60^\circ\text{C}}$	$R^2_{80^\circ\text{C}}$	$R^2_{40^\circ\text{C}}$	$R^2_{60^\circ\text{C}}$	$R^2_{80^\circ\text{C}}$
TDS	0,832	0,987	0,866	0,910	0,636	0,994
$G$	0,832	0,993	0,865	0,908	0,638	0,993
% stv	0,714	0,968	0,875	0,476	0,371	0,980
ABTS	0,032	0,318	0,543	0,460	0,937	0,051
UF	0,823	0,985	0,895	0,679	0,928	0,999

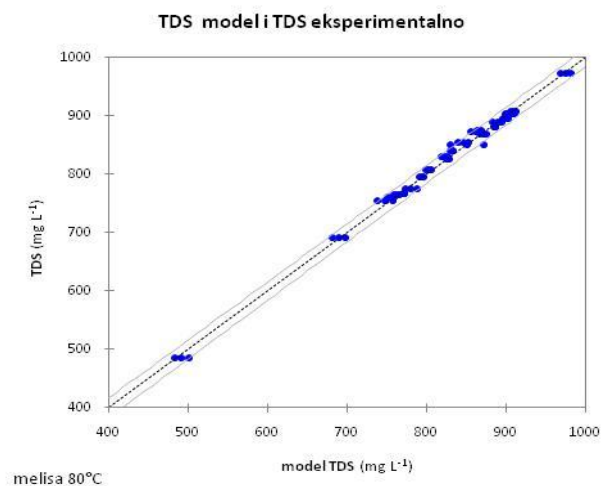
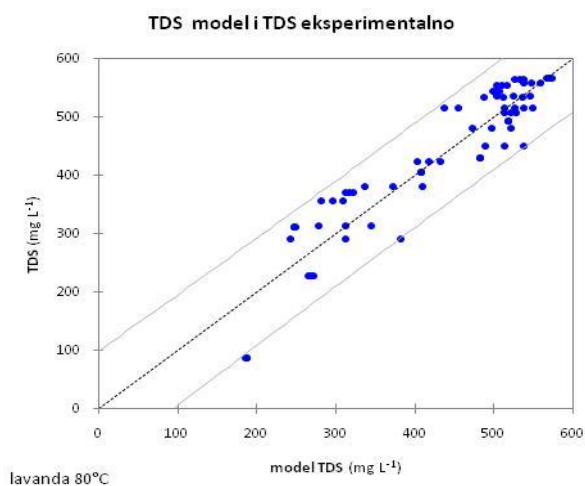
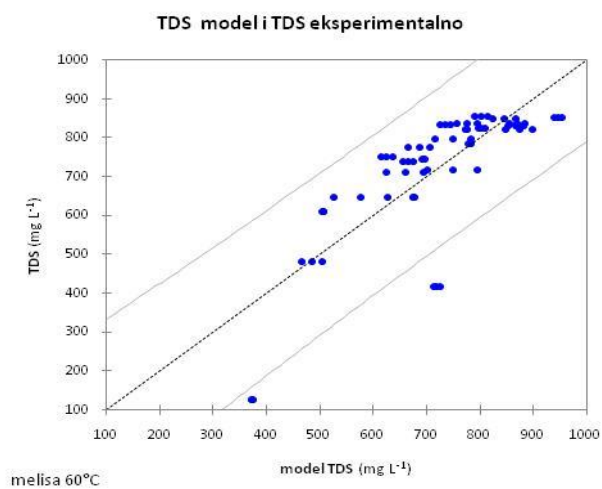
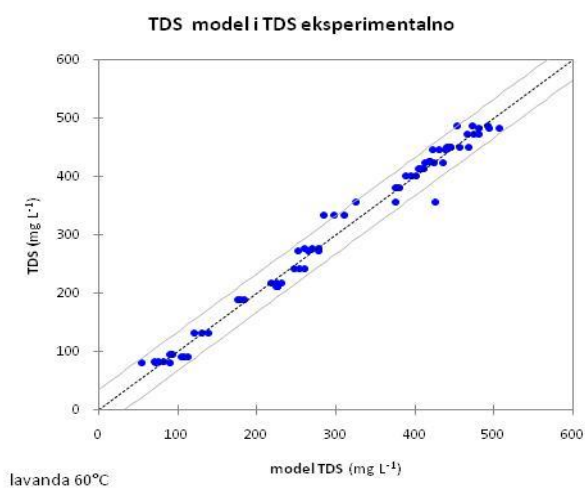
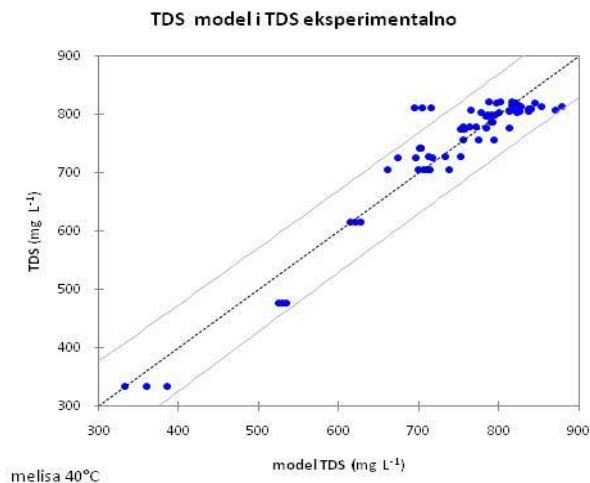
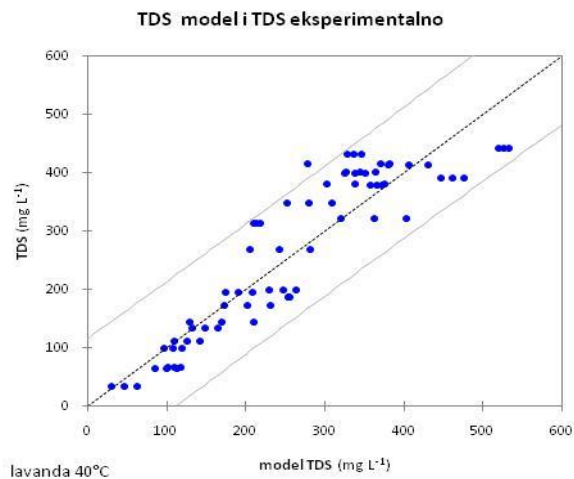
Kada se PLS modeli koriste u predikciji ukupnih otopljenih tvari (TDS) i vodljivosti ( $G$ ) za vodene ekstrakte lavande (40 °C, 60 °C i 80 °C) i melise (40 °C i 80 °C), vidljivo je dobro slaganje eksperimentalno dobivenih rezultata sa modelom ( $R^2 > 0,83$ ). Nešto slabije odstupanje

može se uočiti za vodeni ekstrakt melise (60 °C), pri čemu  $R^2$  iznosi 0,636 (tablica 6) (slike 20 i 21).

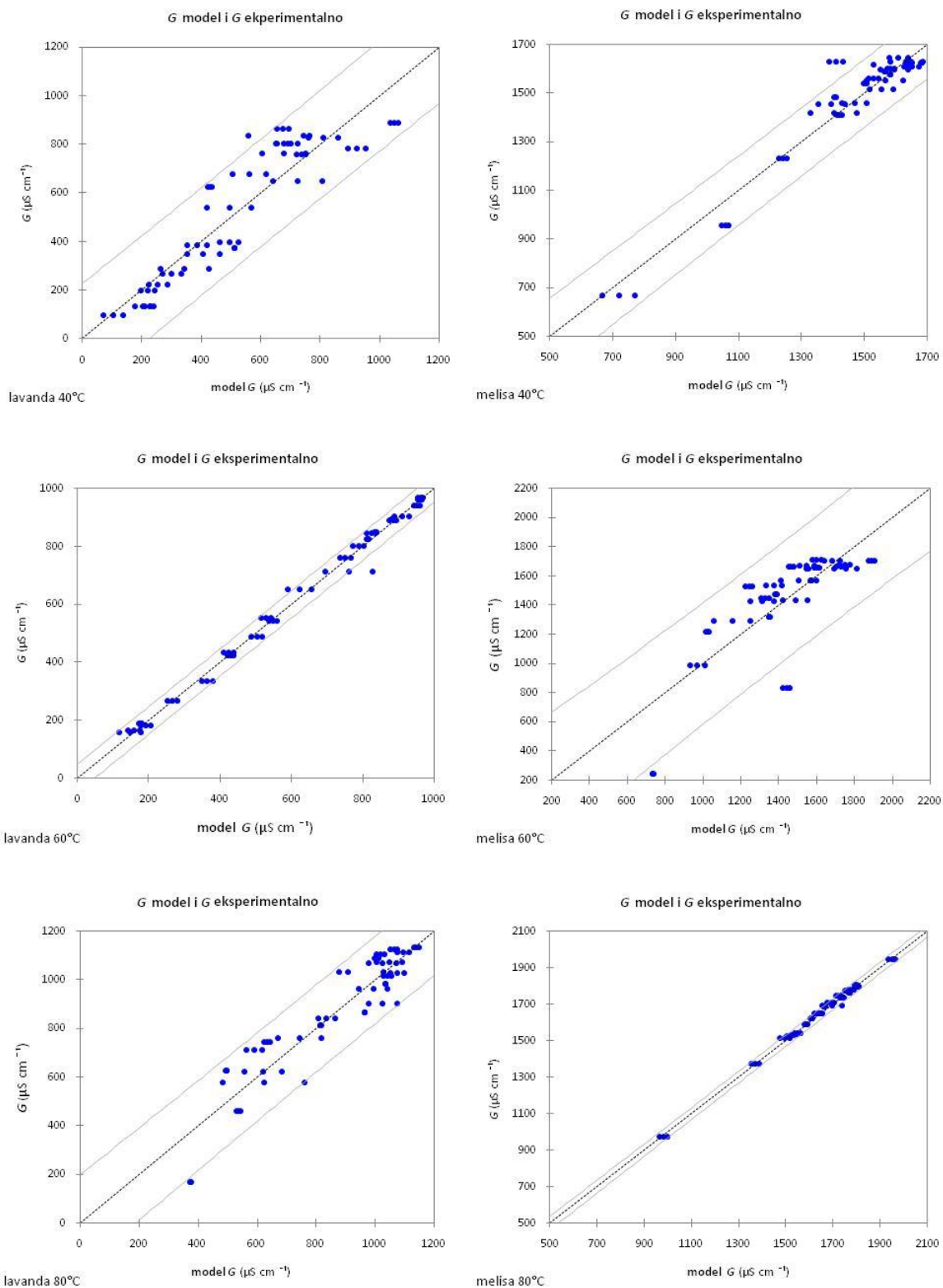
Kada se PLS modeli koriste u predikciji udjela ukupnih polifenola za vodene ekstrakte lavande (40 °C, 60 °C i 80 °C) i melise (60 °C i 80 °C), također je vidljivo dobro slaganje eksperimentalno dobivenih rezultata sa modelom ( $R^2 > 0,82$ ). Slabije slaganje eksperimenta sa modelom vidljivo je za vodeni ekstrakt melise (40 °C), pri čemu  $R^2$  iznosi 0,68 (tablica 6) (slika 24).

PLS modeli mogu se primijeniti za predikciju udjela suhe tvari za vodene ekstrakte lavande (40 °C, 60 °C i 80 °C) i melise (80 °C) ( $R^2 > 0,71$ ) dok je značajno odstupanje uočeno za vodeni ekstrakt melise (40 °C i 60 °C) ( $R^2_{40\text{ °C}} = 0,476$  i  $R^2_{60\text{ °C}} = 0,371$ ) (tablica 6, slika 22).

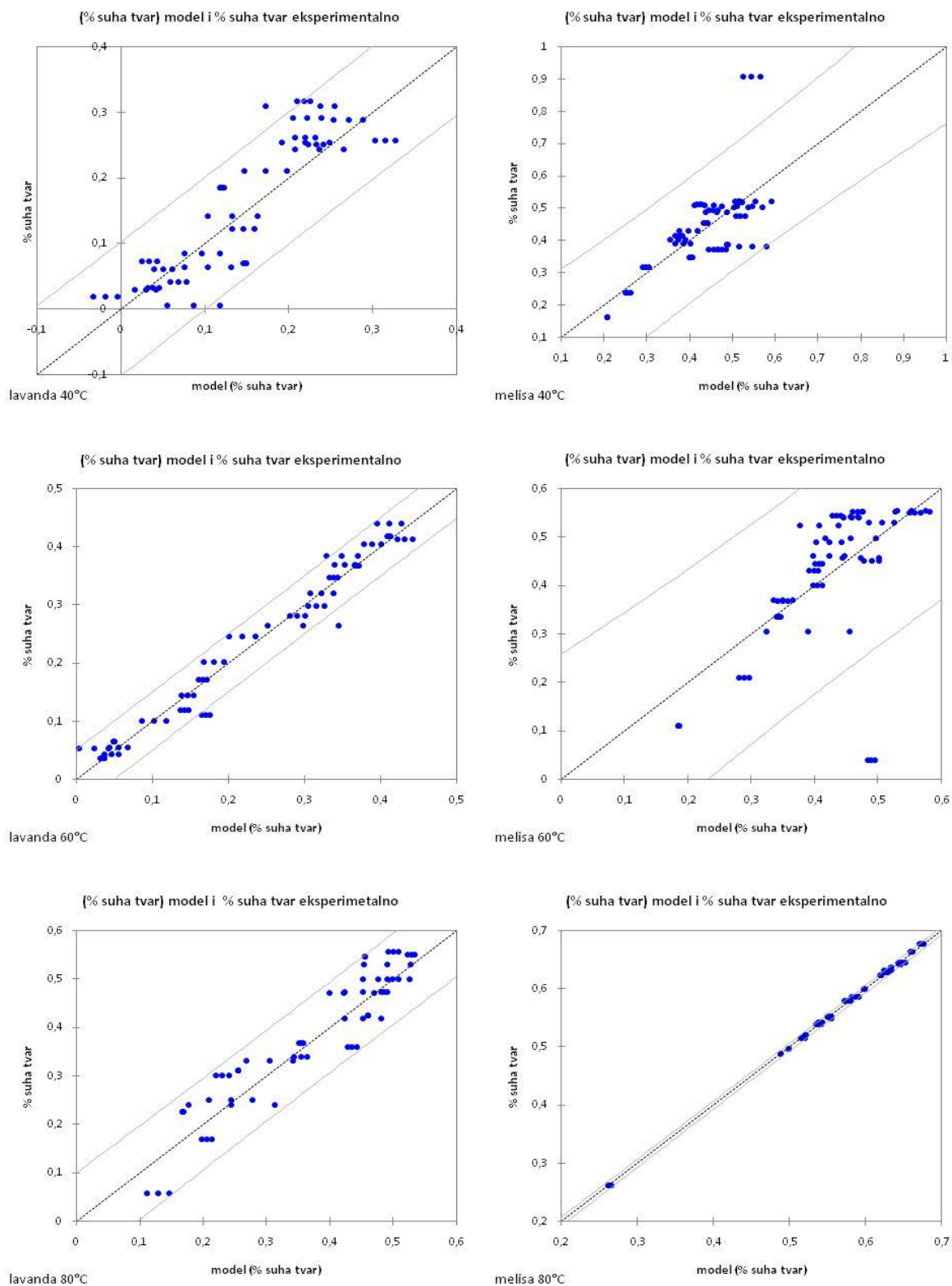
Velike varijacije u koeficijentima determinacije vidljivi su za predikciju antioksidacijske aktivnosti određivane ABTS metodom čije vrijednosti su od 0,032 (lavanda,  $R^2_{40\text{ °C}}$ ) do 0,937 (melisa,  $R^2_{60\text{ °C}}$ ) te bi bilo subjektivno procijeniti kako postoji potencijal za predikciju antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS metode, na osnovu UV spektra u području od 411 do 900 nm (tablica 6, slika 23).



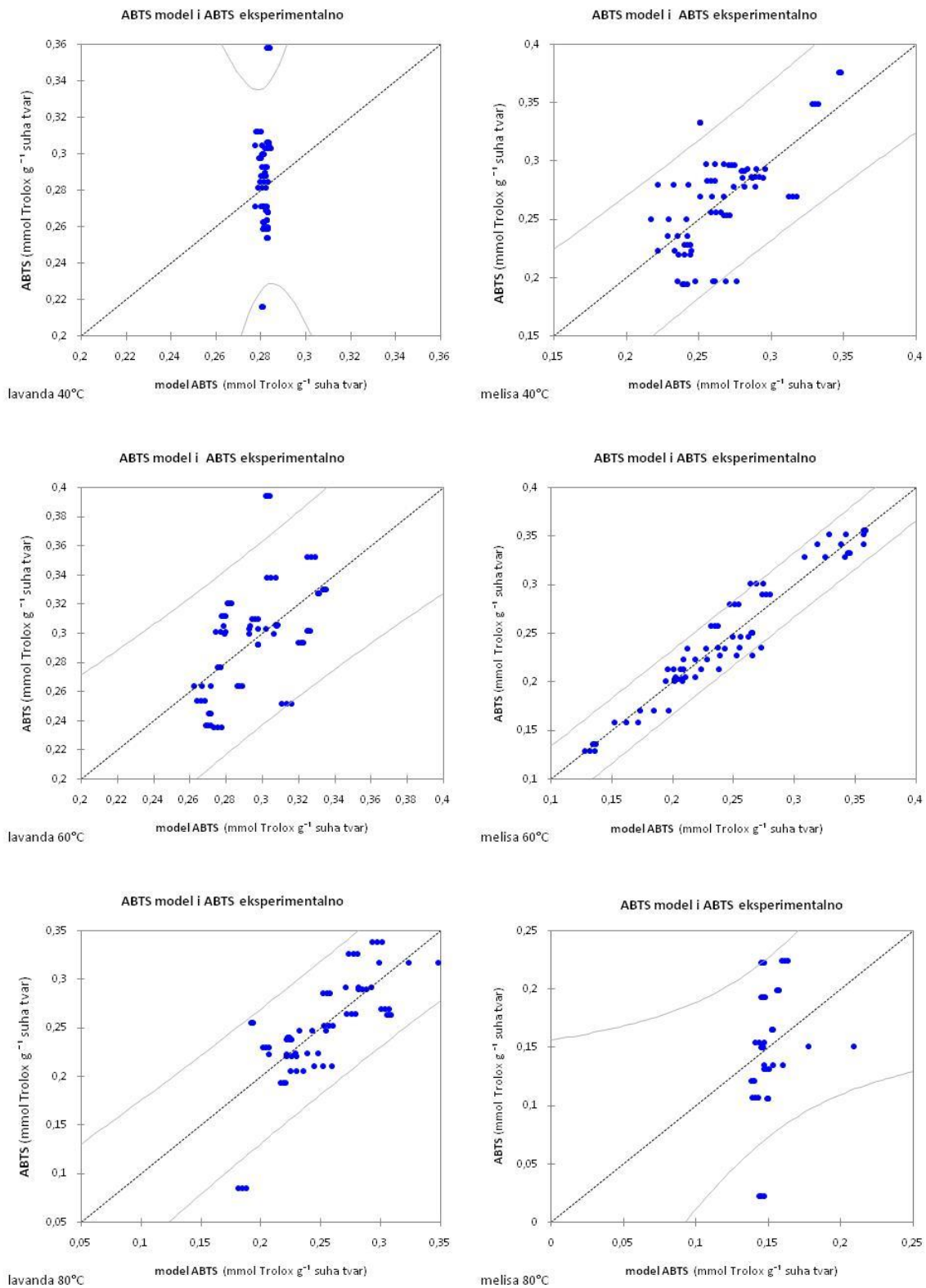
**Slika 20.** Rezultati primjene PLS regresije u predikciji TDS-a ( $\text{mg L}^{-1}$ ) uz interval pouzdanosti od 95%, za ekstrakciju lavande i melise pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C)



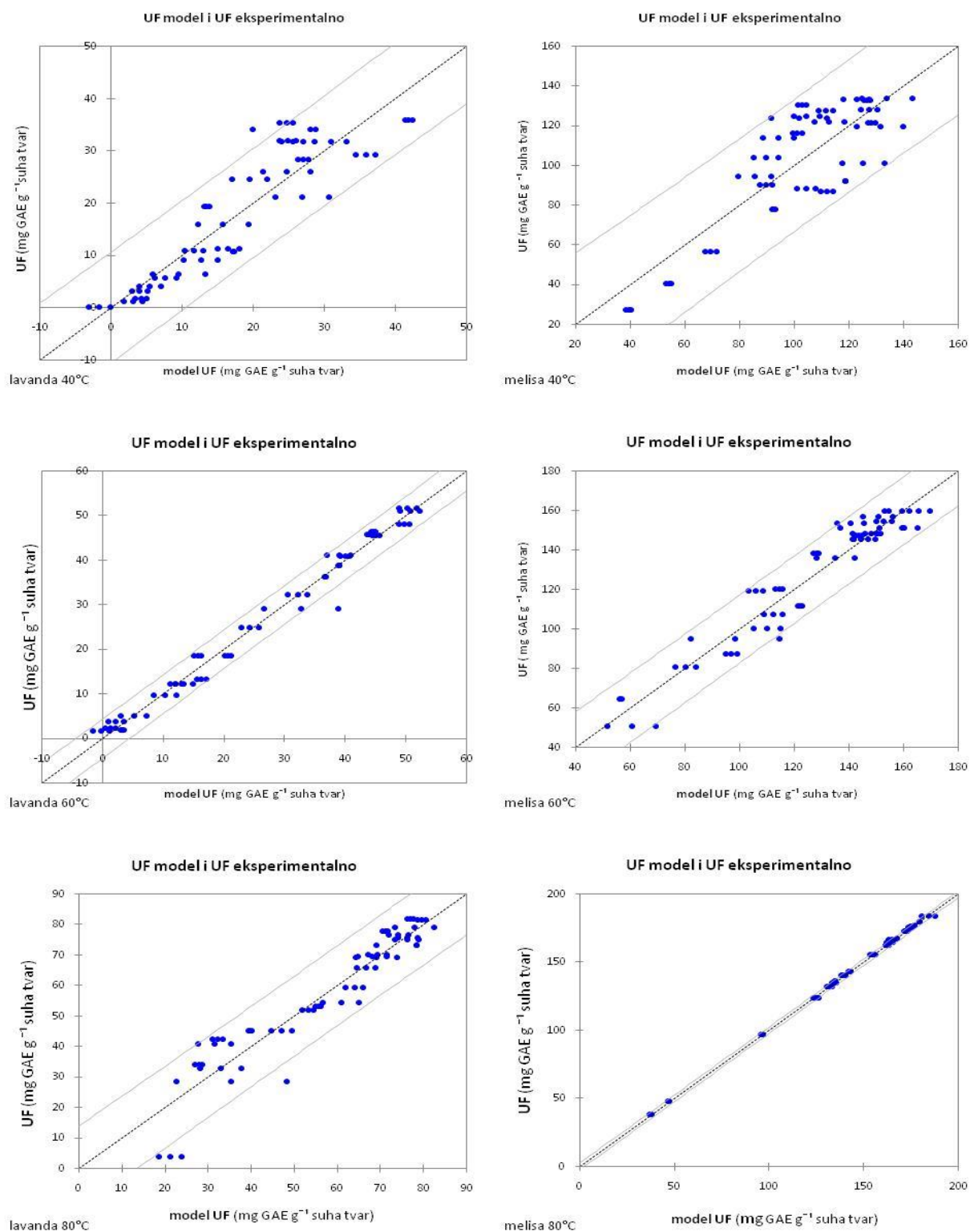
**Slika 21.** Rezultati primjene PLS regresije u predikciji vodljivosti ( $G$ ) ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) uz interval pouzdanosti od 95%, za ekstrakciju lavande i melise pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C)



**Slika 22.** Rezultati primjene PLS regresije u predikciji suhe tvari (%) uz interval pouzdanosti od 95%, za ekstrakciju lavande i melise pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C)



**Slika 23.** Rezultati primjene PLS regresije u predikciji ABTS-a (mmol Trolox g<sup>-1</sup> suha tvar) uz interval pouzdanosti od 95%, za ekstrakciju lavande i melise pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C)



**Slika 24.** Rezultati primjene PLS regresije u predikciji UF-a (mg GAE g<sup>-1</sup> suha tvar) uz interval pouzdanosti od 95%, za ekstrakciju lavande i melise pri različitim temperaturama (40 °C, 60 °C, 80 °C)



## 5. ZAKLJUČAK

1. Ispitivani vodeni ekstrakti ljekovitog bilja (lavanda i melisa) pokazuju isti trend promjene ukupnih otopljenih tvari (TDS), vodljivosti ( $G$ ), udjela suhe tvari (%), koji s povećanjem temperature i dužim vremenom ekstrakcije rastu.
2. Porastom temperature ekstrakcije raste i udio ukupnih polifenola (UF). Najveći udio UF za ekstrakt melise iznosi 183,69 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 80°C dok najmanji udio UF iznosi 133,63 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 40 °C. Najveći udio UF za ekstrakt lavande iznosi 81,84 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 80°C dok najmanji udio UF iznosi 35,85 mg GAE g<sup>-1</sup> suhe tvari pri 40 °C. Utjecaj vremena ekstrakcije istovremeno u funkciji temperature pa su tako pri temperaturi 40 °C, 60 °C, 80 °C dobiveni veći udjeli UF nakon 90 minute ekstrakcije u odnosu na početne minute. Što je vrijeme ekstrakcije duže, udjeli UF u vodenim ekstraktima lavande i melise su veći.
3. Rezultati antioksidacijske aktivnosti, izmjerene ABTS metodom, ne pokazuju trend porasta u odnosu na temperaturu i vrijeme trajanja ekstrakcije, niti prate trend porasta UF, iz čega se može zaključiti da ABTS metoda i nije najprikladnije rješenje za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata lavande i melise.
4. Primjenom jednostavnih linearnih regresijskih modela utvrđena je postojanost veze između fizikalnih (TDS,  $G$ ) i kemijskih parametara (UF) vodenih ekstrakata istraživanih biljaka. Kod vodenog ekstrakta lavande postoji čvrsta veza između UF i TDS-a te UF i  $G$  pri čemu je u oba slučaja koeficijent determinacije velik ( $R^2 > 0,94$ ). Kod vodenog ekstrakta melise veza je slabija, te između UF i TDS-a pri 40 °C koeficijent determinacije iznosi 0,81, dok pri 80°C koeficijent determinacije iznosi 0,326. Isto se događa kada se u obzir uzmu UF i  $G$ , pri čemu je koeficijent determinacije veći ( $R^2=0,81$ ) pri temperaturi ekstrakcije 40 °C, dok porastom temperature veza slabi, odnosno  $R^2$  pri 80 °C iznosi 0,32.
5. Primjenom PCA analize udjeli UF pokazuju visok utjecaj u prvoj glavnoj komponenti (68,45%) dok druga glavna komponenta doprinosi sa 10,21 %, a tu dominira vrijednost ABTS-a. Kako udjeli UF pokazuju visok utjecaj u prvoj glavnoj komponenti, njihov je sadržaj koreliran sa UV-spektrima kako bi se na osnovu UV-spektra mogla predvidjeti koncentracija ukupnih polifenola u nekom vodenom ekstraktu melise i lavande.
6. Obradom podataka dobivenih UV spektroskopskom analizom te primjenom PLS modela dobiveni su regresijski modeli ulaznih varijabli valnih duljina UV spektara s



ciljem predikcije fizikalnih (TDS, *G*, % suhe tvari) i kemijskih parametara (UF, ABTS) vodenih ekstrakata lavande i melise pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C. Na temelju vrijednosti koeficijenata determinacije i grafičkih prikaza primjene PLS regresije može se zaključiti kako se UV spektroskopija pokazala kao potencijalno uspješna metoda u predikciji fizikalnih (TDS, *G*, % suhe tvari) i kemijskih (UF) karakteristika istraživanih biljnih ekstrakata. Značajna odstupanja između eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih primjenom PLS modela primjećena su za antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da samo mjerenje UF nije nužno dobar prediktor antioksidacijske aktivnosti, već da ona ovisi o ukupnom sadržaju i svojstvima svih antioksidativnih vrsta u uzorku ali i o metodi mjerenja.

## 6. LITERATURA

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* **84**, 551-562.

Anonymous 1 (2017) <[https://www.google.hr/search?q=lavanda&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjcaKLzYrUAhXQFsAKHVTwCbgQ\\_AUICigB&biw=1787&bih=883#imgrc=zcd\\_ibTn3cPaaM](https://www.google.hr/search?q=lavanda&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjcaKLzYrUAhXQFsAKHVTwCbgQ_AUICigB&biw=1787&bih=883#imgrc=zcd_ibTn3cPaaM)>. Pristupljeno 25.svibnja 2017.

Anonymous 2 (2017) <[https://www.google.hr/search?q=melissa+officinalis&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMmPrSzIrUAhVKCsAKHZRiBbAQ\\_AUICigB&biw=1787&bih=883#imgrc=hFE6Su1I0CyCfM](https://www.google.hr/search?q=melissa+officinalis&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMmPrSzIrUAhVKCsAKHZRiBbAQ_AUICigB&biw=1787&bih=883#imgrc=hFE6Su1I0CyCfM)>. Pristupljeno 25.svibnja 2017.

AOAC (1995). Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., Arlington VA, USA.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957–998.

Atsumi, T., Tonosaki, K. (2007) Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. *Psychiatry Res.* **150**, 89–96.

Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Billany, M.R., Denman, S., Jameel, S., Sugden, J.K. (1995) Topical antirheumatic agents as hydroxylradical scavengers. *Int J Pharm.* **124**, 279–283.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.

Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L. (1998) The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm Acta Helv.* **72**, 301–305.

Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M.C., Speroni, E. (2002) Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs–Rauscher reaction method. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7504–7509.

de Sousa, A.C., Alviano, D.S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano, C.S., Gattass, C.R. (2004) Melissa officinalis essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol.* **56** (5), 677–681.

Herodez, S.S., Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z. (2003) Solvent extraction study of antioxidants from *Melissa officinalis* L. *Food Chem.* **80**, 275–282.

Horrigan, C. (2005) Aromatherapy in the management and treatment of rheumatoid and musculoskeletal autoimmune disorders. *Int. J.Aromath.* **15**, 15–23.

Jašić, M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. <[http://prirodnamedicina.org/knjige/M.Jasic-Uvid\\_u\\_aktivne\\_bioloski\\_aktivne\\_komponente\\_hrane.pdf](http://prirodnamedicina.org/knjige/M.Jasic-Uvid_u_aktivne_bioloski_aktivne_komponente_hrane.pdf)>. Pristupljeno 8. svibnja 2017.

Jayathilake, C., Rizliya, V., Liyanage, R. (2016) Antioxidant and free radical scavenging capacity of extensively used medicinal plants in Sri Lanka. *Food Sci.* **6**, 123 – 126.

Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line. *Kem. Ind.* **62**, 71–80.

Jia, Z., Tangi, M., Wu, J. (1999) The determination of flavonoid content in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**, 555-559.

Johansen, S.J., Harris, K.A., Rychly, J.D., Ergul, A. (2005) Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *BioMed Central.* **4** (5), 2-4.

Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010) Modelling of the process of solid - liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech J. Food Sci.* **28** (3), 206-212.

Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Belščak Cvitanović, A., Valinger D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J. (2016) Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from *Asteraceae* plants. *Ind. CropsProd.* **91**, 205-214.

- Karande, A.D., Heng, P. W. S., Liew, C.V. (2010) In-line quantification of micronized drug and excipients in tablets by near infrared (NIR) spectroscopy: Real time monitoring of tableting process. *Int. J. Pharm.* **396**, 63–74.
- Karomi, R., Mazerolles, G., Dufour, E. (2003) Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products. *Int. Dairy J.* **13**, 607-620.
- Kaushik, R., Pradeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci. Tech.* **47**, 27-33.
- Kazazić, P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida: A review. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **55**, 279-290.
- Lachman, J., Hosnedl, V., Pivec V., Orsak, M. (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. *Proceedings of Cereals for Human Health and Preventive Nutrition.* **7**, 118–125.
- Lloyd, P.J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, str. 1-24.
- Nichols, J.A., Katiyar, S.K. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* **302**, 71–83.
- Penner, M.H. (2010) Basic Principles of Spectroscopy. U: Food analysis, (Nielsen, S., ured.), Springer science+Business Media, LLC, str 375-385.
- Prior, R. L., Xu, X. (2013) Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *Am. J. Biomed. Sci.* **5 (2)**, 126-139.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* **53**, 4290–4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.

- Sandhar, K.H., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P. (2011) A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. **1**, 25-26.
- Singh, B. (2001) Aromatherapy: The best way to relax using essential oils. *Agric Watch*. **1** (4), 50-62.
- Singh, N., Niyogi, R.G., Mishra, D., Sharma, M., Singh, D. (2013) Antioxidants in Oral Health and Diseases: Future Prospects. *J. Dental Med. Sci*. **10** (3), 36-40.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphormolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol.Vitic*. **16**, 144-158.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. **299**, 152–179
- Siurin, S.A. (1997) Effects of essential on lipid peroxidation and lipid metabolism in patients with chronic bronchitis. *Klin Med Moskau*. **75**, 43–45.
- Sokovic, M., Glamoclija, J., Marin, P.D., Brkic, D., van Griensven, L.J. (2010) Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*. **15** (11), 7532–7546.
- 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.
- Šišić, M., Kuli, S. (2014) Chemical methods in food analysis. *Pharm- health*. **3**, 144-148.
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J PharmRes*. **7**, 1090-1091.
- Teixeira, A., Baenas, N., Domingez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci*. **15**, 15638-15678.

Triantaphyllou, K., Blekas, G., Boskou, D. (2001) Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *Int J Food Sci Nutr.* **52** (4), 313–317.

Valls-Pedret, C., Lamuela-Raventos, R.M., Medina-Remon, A., Quintana, M., Corella, D., Pinto, X., Martinez-Gonzalez, M.A., Estruch, R., Ros, E. (2012) Polyphenol-rich foods in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. *J Alzheimers Dis.* **29**, 1–10.

Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H. (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog.* **45**, 164–174.

Wheatley, D. (2005) Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *J. Psychopharmacol.* **19**, 414–421.

Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem.* **52**, 4026–4037.