

Određivanje ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijske aktivnosti i fizikalno-kemijskih parametara macerata pelina (*Artemisia absinthium* L.)

Strmo, Leonarda

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:310146>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prije diplomski studij Biotehnologija**

**Leonarda Strmo
0058217477**

**ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA,
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I FIZIKALNO-
KEMIJSKIH PARAMETARA MACERATA PELINA
(*Artemisia absinthium* L.)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: dr. sc. Karla Hanousek Čiča

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijske aktivnosti i fizikalno-kemijskih parametara macerata pelina (*Artemisia absinthium* L.)

Leonarda Strmo, 0058217477

Sažetak: Pelinkovac je jako alkoholno piće koje pripada kategoriji likera, a proizvodi se aromatiziranjem etanola maceratima aromatskog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Artemisia absinthium* L.). Jaka alkoholna pića dobivena maceracijom aromatskog i ljekovitog bilja, uz spojeve koji daju karakterističnu aromu, boju i okus, sadrže i fenolne spojeve, nosioce antioksidacijske aktivnosti. Cilj rada je istražiti utjecaj trajanja maceracije i volumnog udjela etanola (25, 40, 55 i 70 % vol.) u vodeno-alkoholnoj bazi na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i fizikalno-kemijske parametre (pH, ukupni ekstrakt, kromatske parametre) macerata pelina. Volumni udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi i trajanje maceracije imaju značajan utjecaj na promatrane parametre. Najveća količina ukupnih fenola ($643,78 \pm 6,90$ mg L⁻¹ GAE) izmjerena je u uzorku s 40 % volumnog udjela etanola. Ekstrakcija fenola tijekom maceracije završila je nakon 1 tjedna maceracije. Antioksidacijska aktivnost macerata pelina ovisi o količini ekstrahiranih fenolnih spojeva.

Ključne riječi: pelin, maceracija, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, fizikalno-kemijski parametri

Rad sadrži: 34 stranice, 11 slika, 8 tablica, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Karla Hanousek Čiča

Datum obrane: 8. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Determination of phenolic compounds, antioxidant activity and physicochemical parameters of wormwood macerates (*Artemisia absinthium* L.)

Leonarda Strmo, 0058217477

Abstract: Pelinkovac is a strong alcoholic beverage belonging to the liqueur category, produced by flavouring ethanol with macerates of aromatic plants, in which the wormwood (*Artemisia absinthium* L.) dominates in composition and quantity. Strong alcoholic beverages obtained by maceration of aromatic and medicinal herbs contain phenolic compounds, which are carriers of antioxidant activity, in addition to compounds that confer characteristic aroma, colour and taste. The aim of this work is to investigate the influence of maceration time and ethanol content (25, 40, 55 and 70 % vol.) in the hydro-alcoholic base on the content of phenolic compounds, antioxidant activity and physicochemical parameters (pH, total extract, chromatic parameters) of wormwood macerates. The ethanol content in the hydro-alcoholic base and the maceration time have a significant influence on the observed parameters. The highest amount of total phenols ($643.78 \pm 6.90 \text{ mg L}^{-1}$ GAE) was measured in the sample with 40 % of ethanol. Phenols extraction during maceration ended after 1 week of maceration. The antioxidant activity of wormwood macerate depends on the amount of extracted phenolic compounds.

Keywords: wormwood, maceration, phenolic compounds, antioxidant activity, physicochemical parameters

Thesis contains: 34 pages, 11 figures, 8 tables, 35 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Karla Hanousek Čiča, PhD

Thesis defended: September 8, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA	2
2.1.1. LIKERI	5
2.1.2. PROIZVODNJA HRVATSKOG PELINKOVCA.....	6
2.2. GORSKI PELIN (<i>ARTEMISIA ABSINTHIUM L.</i>)	7
2.2.1. FITOKEMIJSKI SASTAV	7
2.2.2. UČINAK NA ZDRAVLJE.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. BILJNI MATERIJAL	12
3.1.2. KEMIKALIJE I OPREMA	12
3.2. METODE	12
3.2.1. POSTUPAK PRIPREME MACERATA PELINA	12
3.2.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA (TPC).....	14
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	15
3.2.3.1. DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL RADIKAL) METODA.....	15
3.2.3.2. ABTS (2,2'-AZINODI-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFONAT)) METODA.....	16
3.2.4. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI.....	18
3.2.4.1. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI	18
3.2.4.2. ODREĐIVANJE UKUPNOG EKSTRAKTA	18
3.2.4.3. ODREĐIVANJE KROMATSKIH PARAMETARA	18
3.2.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	20

4.	REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1.	REZULTATI ODREĐIVANJA KOLIČINE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA (TPC)	21
4.2.	REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI MACERATA PELINA	23
4.3.	REZULTATI ODREĐIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA MACERATA PELINA	25
4.3.1.	REZULTATI pH VRIJEDNOSTI MACERATA PELINA	25
4.3.2.	REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNOG EKSTRAKTA MACERATA PELINA	26
4.3.3.	REZULTATI KROMATSKIH PARAMETARA MACERATA PELINA	27
5.	ZAKLJUČCI	29
6.	POPIS LITERATURE.....	30

1. UVOD

Jaka alkoholna pića obuhvaćaju pića s najmanjom alkoholnom jakosti od 15 % vol., a namijenjena su ljudskoj potrošnji i imaju posebna organoleptička svojstva. Zapisi o proizvodnji i konzumaciji jakih alkoholnih pića potječu još od drevnih civilizacija pa sve do suvremenog doba. Jaka alkoholna pića proizvode se destilacijom fermentiranih voćnih, žitnih i šećernih komina, maceracijom ili sličnom preradom biljnih tvari u etanolu, dodavanjem aroma, bojila, sladila ili drugih prehrambenih proizvoda, zasebno ili u kombinaciji, etanolu ili miješanjem jakih alkoholnih pića, etanola i drugih prehrambenih proizvoda.

Tradicionalno jako alkoholno piće je hrvatski pelinkovac koji pripada kategoriji likera. Proizvodi se aromatiziranjem etilnog alkohola maceratima aromatskog bilja prvenstveno pelina (*Artemisia absinthium*), zatim komorača (*Foeniculum vulgare*), kadulje (*Salvia officinalis*), mente (*Menta piperita*) te još oko 20-30 drugih biljnih vrsta koje su poznate proizvođačima, ali ne nužno i potrošačima, s obzirom da je receptura proizvoda proizvođačka tajna. Hrvatski pelinkovac konzumira se kao aperitiv i digestiv, a pripisuju mu se razna ljekovita svojstva, prvenstveno jer se biljka pelin koristi u narodnoj medicini preko 3000 godina (Tehnička dokumentacija Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, 2016). Pelin (*Artemisia absinthium* L.) višegodišnja je zeljasta biljka koja na prostoru Hrvatske raste samoniklo, a kao samonikla ili kultivirana vrsta rasprostranjena je diljem Europe, Azije i Sjeverne Amerike (Kolak i sur., 2004).

Cilj rada je istražiti utjecaj trajanja maceracije i volumnog udjela etanola (25 %, 40 %, 55 %, 70 % vol.) u vodeno-alkoholnoj bazi na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i fizikalno-kemijske parametre macerata pelina. U vremenskom periodu od 2 tjedna, koliko je trajala maceracija, određeni su ukupni fenolni spojevi (TPC), antioksidacijska aktivnost te fizikalno-kemijski parametri kvalitete macerata, odnosno pH vrijednost, ukupni ekstrakt te kromatski parametri. Na temelju dobivenih rezultata donešen je zaključak o utjecaju vremena i volumnog udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi na kvalitetu macerata pelina te su određeni optimalni parametri maceracije pelina za dobivanje macerata koji se može koristiti u proizvodnji pelinkovca.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jaka alkoholna pića

Prema Uredbi Europske Unije (Uredba (EU) 2019/787), jaka alkoholna pića su pića namijenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva, sadrže minimalno 15 % vol. alkohola, a proizvedena su:

Izravno:

- destilacijom, sa ili bez dodavanja aroma, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla,
- maceracijom ili sličnom preradom biljnih tvari u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla ili u destilatima poljoprivrednog podrijetla,
- dodavanjem aroma, šećera ili drugih sladila i/ili drugih poljoprivrednih proizvoda i/ili prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla

Miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više:

- drugih jakih alkoholnih pića,
- etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla,
- drugih alkoholnih pića

Etilni alkohol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića i svih njihovih sastojaka mora biti poljoprivrednog podrijetla, ne smije imati okus i miris drugačiji od onoga koji potječe od upotrijebljenih sirovina i mora imati minimalno 96,0 % vol. (Uredba (EU) 2019/787).

Podjela jakih alkoholnih pića, prema navedenoj Uredbi EU (2019/787), je na prirodna (tradicionalna) jaka alkoholna pića dobivena destilacijom određene sirovine (pića pod brojevima 1-14 u tablici 1) i miješana jaka alkoholna pića dobivena dodatkom etanola, bilja, aromatičnih tvari ili drugih dodataka u destilat, koja mogu biti obojena i zaslađena (pića pod brojevima 15-44 u tablici 1).

Prirodna jaka alkoholna pića proizvode se alkoholnom fermentacijom i destilacijom isključivo sirovina utvrđenih odgovarajućom kategorijom jakih alkoholnih pića, nije dozvoljen dodatak alkohola, razrijeđenog ili nerazrijeđenog, nisu aromatizirana niti zaslađena (osim da bi se zaokružio konačni okus proizvoda), bojena su samo karamelom koji se upotrebljava isključivo za prilagodbu boje tih alkoholnih pića te ne sadržavaju dodatke, osim cijelih nepretrađenih dijelova sirovina iz kojih se taj alkohol dobiva, i koji se uglavnom koriste u dekorativne svrhe.

Miješana jaka alkoholna pića mogu biti proizvedena od bilo koje poljoprivredne sirovine definirane u Uredbi EU (2019/787) za pojedino jako alkoholno piće, a mogu imati dodan alkohol te sadržavati aromatične tvari, prirodne aromatične tvari, aromatične pripravke i aromatizirane prehrambene proizvode te mogu biti obojena i zaslađena.

Tablica 1. Podjela jakih alkoholnih pića (Uredba EU 2019/787)

Redni broj	Naziv pića	Redni broj	Naziv pića
1	Rum	23	Jako alkoholno piće aromatizirano kimom ili <i>Kümmel</i>
2	<i>Whisky</i> ili <i>whiskey</i>	24	<i>Akvavit</i> ili <i>aquavit</i>
3	Žitna rakija	25	Jako alkoholno piće aromatizirano anisom
4	Rakija od vina	26	<i>Pastis</i>
5	<i>Brandy</i> ili <i>Weinbrand</i>	27	<i>Pastis de Marseille</i>
6	Rakija od groždane komine ili komovica	28	<i>Anis</i> ili <i>janeževac</i>
7	Rakija od voćne komine	29	Destilirani <i>anis</i>
8	Rakija od groždica ili <i>raisin brandy</i>	30	Gorko jako alkoholno piće ili <i>bitter</i>
9	Rakija od voća	31	Aromatizirana votka
10	Rakija od jabučnog vina, rakija od kruškovog vina i rakija od jabučnog i kruškovog vina	32	Jako alkoholno piće aromatizirano divljom šljivom ili <i>pacharán</i>
11	Rakija od meda	33	Liker
12	<i>Hefebrand</i> ili rakija od taloga	34	Krem liker od (uz dodan naziv upotrijebljenog voća ili druge sirovine)

Tablica 1. Podjela jakih alkoholnih pića - *nastavak* (Uredba EU 2019/787)

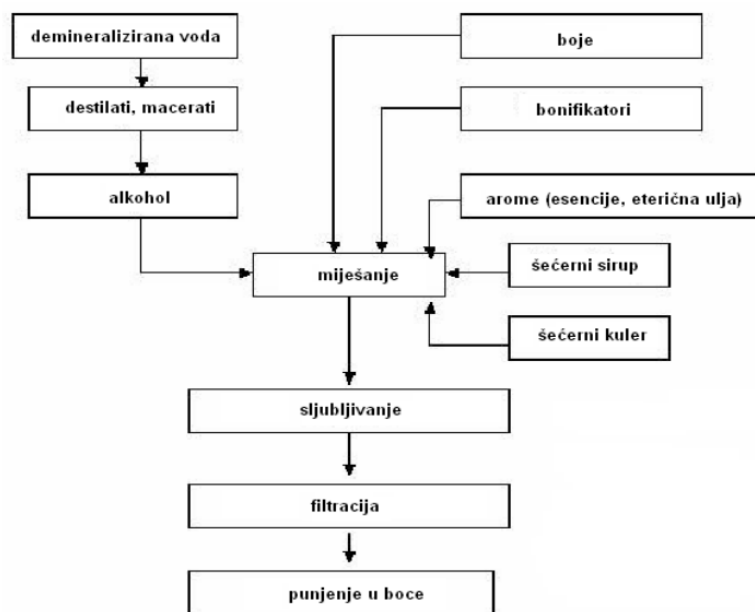
13	Rakija od piva	35	<i>Sloe gin</i>
14	<i>Topinambur</i> ili rakija od jeruzalemske artičoke	36	<i>Sambuca</i>
15	Votka	37	<i>Maraschino, marrasquino</i> ili <i>maraskino</i>
16	Rakija (s dodanim imenom voća, bobica ili orašastog voća) dobivena maceracijom i destilacijom	38	<i>Nocino</i> ili <i>orehovec</i>
17	<i>Geist</i> (s dodanim nazivom upotrijebljenog voća ili sirovine)	39	Liker od jaja ili <i>advocat</i> ili <i>avocat</i> ili <i>advokat</i>
18	Encijan	40	Liker s jajima
19	Jako alkoholno piće aromatizirano borovicom	41	<i>Mistrà</i>
20	<i>Gin</i>	42	<i>Väkevä glögi</i> ili <i>spritglögg</i>
21	Destilirani <i>gin</i>	43	<i>Berenburg</i> ili <i>Beerenburg</i>
22	<i>London gin</i>	44	Nektar od meda ili nektar od medovine

2.1.1. Likeri

Prema Uredbi Europske Unije 2019/787 liker je jako alkoholno piće koje sadržava najmanju količinu sladila, izraženu kao invertni šećer, od:

- 70 g L⁻¹ za liker od trešnje ili višnje, čiji se etilni alkohol sastoji isključivo od rakije od trešnje ili višnje,
- 80 g L⁻¹ za likere koji su aromatizirani isključivo encijanom ili sličnom biljkom ili pelinom,
- 100 g L⁻¹ u svim drugim slučajevima;

Liker je jako alkoholno piće proizvedeno upotrebom etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla ili destilata poljoprivrednog podrijetla ili jednog ili više jakih alkoholnih pića ili njihovom kombinacijom, zaslađeno i s dodatkom jedne ili više aroma, proizvoda poljoprivrednog podrijetla ili prehrambenih proizvoda. Za proizvodnju likera mogu se upotrebljavati aromatične tvari i aromatični pripravci (slika 1). Alkoholna jakost likera iznosi najmanje 15 % vol. (Uredba EU, 2019/787).



Slika 1. Opća shema proizvodnje likera (Grba i Stehlik-Tomas, 2010)

2.1.2. Proizvodnja hrvatskog pelinkovca

Hrvatski pelinkovac je tradicionalno jako alkoholno piće koje pripada kategoriji likera. Dobiva se aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla maceratima aromatskog bilja u kojima po sastavu i količini dominira biljka pelin (*Artemisia absinthium* L.) te se zaslađuje.

Karakteristike proizvoda

Boja konačnog proizvoda potječe od macerata aromatskog bilja. Raspon boje kreće se od svijetlo do tamnije smeđe, a najčešće se zadržava u granicama tople smeđe boje. Miris pelinkovca potječe od aromatskog bilja, a s obzirom da je pelin dominantna komponenta ističe se i u mirisu proizvoda. Prevladavaju travnate note pelina, a intenzivnost je izražena. Okus hrvatskog pelinkovca je svjež s nazalnom taninskom notom, dugotrajan je te prevladava karakteristična gorčina. Udio alkohola mora biti u rasponu 27-31 % vol. alkohola, a količina dodanog šećera iznosi između 100 i 170 g L⁻¹ (Tehnička dokumentacija Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, 2016).

Postupak proizvodnje

Postupak proizvodnje započinje proizvodnjom macerata. Macerat se proizvodi potapanjem odabrane smjese usitnjenog aromatskog bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla. Maceracija traje od 15 do 30 dana, ovisno o temperaturi i aromatičnosti bilja. Dio macerata nakon maceracije se destilira. Destilat sadrži 60-70 % vol. alkohola, a nakon destilacije se miješa s preostalim maceratom uz dodatak dozvoljenih prehrambenih aditiva kao što su karamel, askorbinska kiselina i sl. Tako dobiveni pripravak se upotrebljava za proizvodnju hrvatskog pelinkovca uz dodatak šećera i vodeno-alkoholne otopine. Harmonizacija (sljubljivanje) svih sastojaka traje minimalno 7 dana (Tehnička dokumentacija Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, 2016).

Osim maceracije pelina (*Artemisia absinthium* L.) koji prevladava te se obično dodaje u udjelu od 20 %, mogu se dodati i dijelovi biljke komorača (*Foeniculum vulgare* L.), kadulje (*Salvia officinalis* L.) te mente (*Menta piperita* L.). Međutim, ne postoji jedinstvena receptura tj. sastav, već dodatak ostalog aromatičnog bilja i sama količina ovisi o području proizvodnje, godišnjem dobu te individualnoj recepturi svakog proizvođača (Tehnička dokumentacija Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske, 2016).

2.2. Gorski pelin (*Artemisia absinthium* L.)

Gorski pelin višegodišnja je zeljasta biljka koja raste diljem Europe, Azije i Sjeverne Amerike, kao kultivirana vrsta ili samoniklo. Najveći proizvođači pelina u svijetu su Ukrajina, Francuska, Italija, Njemačka te Sjedinjene Američke Države. Na prostorima Republike Hrvatske raste samoniklo, a Hrvatsko gorje bogato je gorskim pelinom koji se može naći na livadama, travnjacima, oranicama, uz rubove šuma i sl. Ljekovita svojstva gorskog pelina poznata su već više od 3000 godina, a pronađeni su i zapisi da se koristio još u doba starog Egipta.

Gorski pelin pripada rodu *Artemisia* L. koji zajedno sa nekim drugim rodovima kao na primjer *Aster* L., *Lactuca* L., *Gerbera* L. i dr. pripada redu *Asterales*. Cijela je porodica poznata po gorčini svih dijelova biljaka.

Sama biljka može narasti u visinu do 100 cm, a korijen je drvenast i prodire na dubinu tla od 50 do 90 cm. Živi 4 do 12 godina. Stabljika je okruglasta, razgranata i prekrivena srebrnkastostivim dlačicama. Listovi su dva do tri puta perasto razdijeljeni te prekriveni dlačicama. Cvjetovi su sitni, žućkasti te sastavljeni u glavice koje su metličasto raspoređene po biljci (slika 2). Plod je roška (*achenium*) bez kundare (*pappus*), sjeme je vrlo sitno i zadržava klijavost jednu do dvije godine. Biljka cvate od srpnja do listopada (Kolak i sur., 2004).



Slika 2. Gorski pelin (*Artemisia absinthium* L.) (Marjan, 2010)

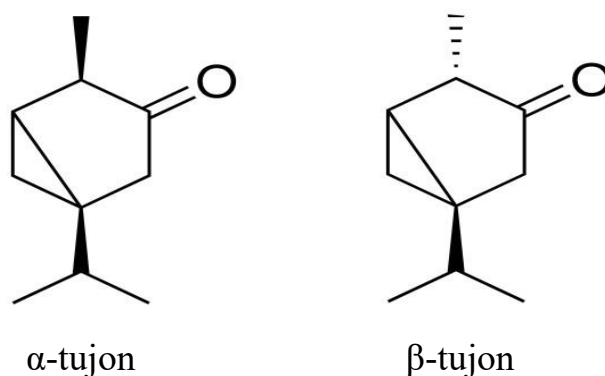
2.2.1. Fitokemijski sastav

Gorski pelin (*Artemisia absinthium* L.) sastoji se pretežno od terpenoida, flavonoida, kumarina, polifenola, sterola, acetilena te kafeoil-kine kiseline (Bhat, 2019.)

Biološki aktivne komponente gorskog pelina su hlapljiva ulja koja uključuju α -tujon i β -tujon, seskviterpenski laktoni absintin, artemetin, matricin, izoabsintin i artemolin, acetileni, flavonoidi, fenolne kiseline i lignani (Hoffman, 2003).

Tujon

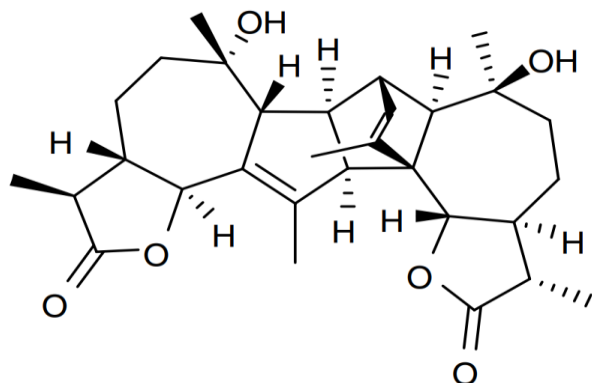
Tujon (1-izopropil-4-metilbiciklo[3.1.0]heksan-3-on) je biciklički ketonski terpen koji je jedna od glavnih aktivnih komponenata gorskog pelina. Može se naći u dva epimerna oblika – (-)- α -tujon i (+)- β -tujon (slika 3). Učinku tujona pripisano je halucinogeno i problematično ponašanje potrošača apsinta. Međutim, istraživanja su pokazala da apsint ne sadrži dovoljne količine tujona koje bi mogle izazvati takve posljedice, već da je uzrok takvog ponašanja pretjerana konzumacija alkohola. Potvrđeno je da tujon nema posljedice na fizičko i psihičko zdravlje ukoliko se ne kozumira u ekstremno velikim dozama (Bhat, 2019).



Slika 3. Kemijska struktura α -tujona i β -tujona (Padosch i sur., 2006)

Seskviterpenski laktoni

Seskviterpenski laktoni daju karakterističnu gorku aromu pelinu. Glavni goraki konstituent je absintin (slika 4), a gorčini doprinose i anabsin, ketopelenolid-b te anabsintin (Bhat,2019).



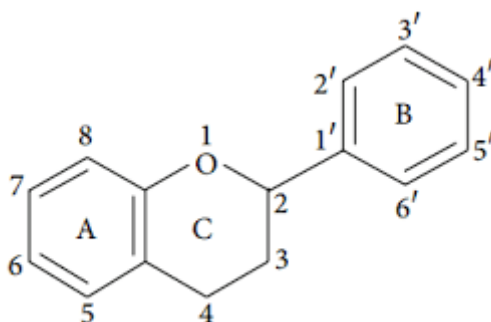
Slika 4. Kemijska struktura absintina (Lachenmeier, 2007)

Polifenoli

Polifenoli su među najistraživanijim fitokemikalijama zadnjih godina s obzirom na njihovu široku distribuciju u biljnom carstvu te svakodnevnu ljudsku konzumaciju. Polifenoli su spojevi koji u svojoj strukturi imaju više od jedne hidroksilne skupine koja je vezana na jedan ili više benzenskih prstenova. Pripisuje im se potencijalna uporaba kao profilaktički ili terapijski agensi zbog njihovih antioksidacijskih svojstava. Distribucija fenolnih spojeva u biljnoj strukturi nije jednolična, ali je njihova uloga neophodna za normalno funkcioniranje biljaka i biljnih stanica. Funkcija fenola u biljkama je svestrana, neki sudjeluju u formiranju strukture biljaka i biljnih stanica, neki su zaslužni za pigmentaciju, rast, rezistenciju na biljoždere ili patogene organizme itd. Ovisno o strukturnim karakteristikama mogu se podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Vladimir-Knežević i sur.,2012).

Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu polifenolnih spojeva s više od 6000 identificiranih struktura. Njihovu strukturu sačinjavaju dva benzenska prstena (A i B) povezana sa linearnim propanskim lancem ($C_6C_3C_6$). Taj centralni lanac najčešće formira piranski prsten (C) s jednim od dva benzenska prstena (slika 5). Flavonoidi se, ovisno o strukturi, mogu još podijeliti u 6 podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini te izoflavonoidi (Vladimir-Knežević i sur., 2012). S povećanjem broja hidroksilnih skupina povećava se antioksidacijska aktivnost flavonoida (Kurtagić, 2017).



Slika 5. Opća struktura flavonoida (Panche i sur., 2016)

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su najviše zastupljeni ne-flavonoidi među fenolnim spojevima. Sadrže hidroksicimetnu ili hidroksibenzojevu strukturu, a raznolikost sačinjavaju brojevi i pozicije hidroksi- i metoksi- skupina na benzenskim prstenima (slika 6). Mala količina fenolnih kiselina nalazi se u slobodnoj formi, većina je vezana esterskim, eterskim ili acetalnim vezama za strukturne komponente biljaka (Vladimir-Knežević i sur., 2012). Fenolne kiseline posjeduju

snažnu antioksidacijsku, antimikrobnu, protuupalnu te antikancerogenu aktivnost (Kurtagić, 2017).



Slika 6. Opća struktura hidroksibenzojeve a) i hidroksicimetne b) kiseline (Rocha i sur., 2012)

2.2.2. Učinak na zdravlje

Gorski pelin (*Artemisia absinthium L.*) poznat je u tradicionalnoj medicini još od antičkih civilizacija. U Europskoj tradicionalnoj medicini koristi se za liječenje različitih tegoba, posebno za parazitske infekcije, želučane tegobe te kod pojave vrućice. Prema tradicionalnim zapisima, lišće biljke se koristi za snižavanje temperature, a cvijet pomaže kod želučanih tegoba i infekcija. Tinktura *A. absinthium* koristi se kao tonik i pomoć pri poboljšanju probave (Szopa i sur., 2020).

U suvremeno doba gorski pelin ostao je u fokusu raznih istraživanja s obzirom na širinu primjene i terapijski potencijal. S obzirom da moderan stil života često uključuje ubrzan ritam, stresne uvjete, konzumaciju brzo dostupne i često nezdrave hrane, smanjeno kretanje te onečišćen okoliš i okruženje, zapaženo je povećanje količine slobodnih radikala u ljudskom tijelu i samim time sve učestalija pojava bolesti kao što su zloćudni tumori (Koyuncu, 2018). Antioksidacijska aktivnost spojeva prisutnih u gorskom pelinu omogućava zaštitu stanica od slobodnih radikala, nestabilnih molekula koje neizbježno nastaju u ljudskom tijelu. Prirodni antioksidansi neizbježni su za normalno funkcioniranje organizma, a fenoli prisutni u biljci pokazuju potencijal za terapiju bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom (Sharifi-Rad i sur., 2022). S obzirom da su tumori često smrtonosne bolesti, a terapija zračenjem je invazivna i dugotrajna metoda, biljke koje sadrže antioksidanse, kao što je gorski pelin, intenzivno se istražuju kao antitumorski agensi. Prema istraživanju koje su proveli Lai i Singh (2001), mehanizam antitumorskog djelovanja *A. absinthium* temelji se na reakciji artemisinina ili bilo kojeg njegovog derivata sa ionima željeza pri čemu dolazi do kemijske reakcije u kojoj nastaju slobodni radikali. S obzirom da stanice trebaju ione željeza za replikaciju DNA molekula, a tumorske stanice su karakterizirane nekontroliranom diobom stanica, onda tumorske stanice zah-

tijevaju veće količine željeza za diobu nego zdrave stanice. Stoga, kada su tumorskim stanicama dodane veće količine željeza, a zatim i artemisinin, došlo je do selektivnog izazivanja stanične smrti tumorskih stanica. Pretpostavlja se da bi agresivniji tumori kao što je pankreasna ili akutna leukemija mogli još bolje reagirati s artemisininom, s obzirom da ih karakterizira ubrzana stanična dioba i samim time prisutnost većih količina željeza.

Potencijal gorskog pelina kao terapeutika nije striktno vezan samo uz antitumorsko djelovanje već se proučava u različite svrhe kao što je antidijabetičko djelovanje, utjecaj na poboljšanje imunskog sustava i imuniteta, antimikrobno djelovanje, upotreba u terapiji gastrointestinalnih tegoba, utjecaj na središnji živčani sustav i epilepsiju, a zabilježen je i utjecaj na reproduktivni sustav (Bhat, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Za provedbu eksperimentalnog dijela ovog rada kao biljni materijal korišteni su osušeni i usitnjeni dijelovi biljke pelin (*Artemisia absinthium* L.) proizvođača „Suban“ (Strmec, Hrvatska).

3.1.2. Kemikalije i oprema

Za postupak pripreme macerata pelina te provedbu analiza korištene su navedene kemikalije i oprema:

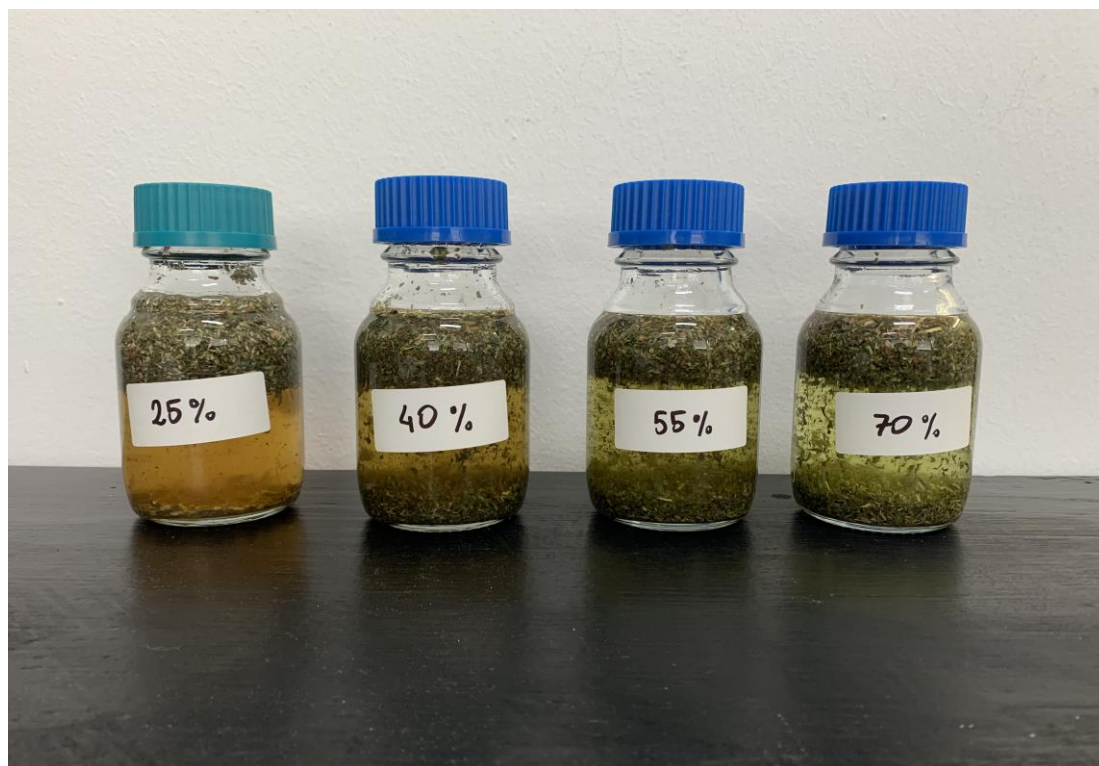
- Folin-Ciocalteu reagens – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat bezvodni – Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda
- etanol 96 % vol.- Kefo (Ljubljana, Slovenija)
- galna kiselina - Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) – Fluka (Offenbach, Njemačka)
- kalijev persulfat – Fluka (Offenbach, Njemačka)
- etanol 100 % vol. - Gram – mol (Zagreb, Hrvatska)
- spektrofotometar Specord 50 Plus - Analytik Jena (Jena, Njemačka)
- pH metar Schott CG 842 – Schott (Mainz, Njemačka)
- laboratorijski sušionik ST-01/02 - Instrumentaria (Sesvete, Hrvatska)
- analitička vaga OHAUS Adventurer AX224 – OHAUS (Nänikon, Švicarska)

3.2. Metode

3.2.1. Postupak pripreme macerata pelina

Maceracija biljnog materijala provedena je tako da je odvagano 10 g biljnog materijala koji je prebačen u posudu s čepom te prelijevan sa 250 mL vodeno-etanolne baze (slika 7). Koncentracija biljnog materijala u uzorcima tijekom maceracije bila je 40 g L⁻¹, dok je volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi bio 25 %, 40 %, 55 %, 70 % (tablica 2). Vodeno-etanolna baza pripravljena je razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena 96 %-tnog etanola sa

destiliranom vodom. Postupak maceracije provodio se pri sobnoj temperaturi, a uzorci su se čuvali na suhom i tamnom mjestu uz povremeno miješanje. Svakih tjedana dana određena je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva te je kraj maceracije određen ustaljenjem koncentracije navedenih spojeva. Nakon završetka maceracije dobiveni macerat je profiltriran kroz filter papir kako bi se uklonio zaostali biljni materijal, a uzorci su čuvani na +4 °C do provedbe analiza.



Slika 7. Uzorci macerata pelina (vlastita fotografija)

Tablica 2. Uvjeti maceracije

Uzorak	Koncentracija pelina (g L ⁻¹)	Volumni udio etanola (%)	Trajanje maceracije (dan)
1	40	25	14
2		40	
3		55	
4		70	

3.2.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Princip metode

Ukupni sadržaj fenola (TPC) određen je kolorimetrijskom metodom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa tj. smjese fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline (Singleton i Rossi, 1965). U reakciji s fenolnim tvarima dolazi do redukcije fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline u wolframov oksid i molibdenov oksid, pri čemu fenolne tvari oksidiraju i dolazi do pojave plavog obojenja. Nakon toga se spektrofotometrijski određuje intenzitet nastalog plavog obojenja na 760 nm. Uporabom standardnih otopina galne kiseline izrađen je baždarni pravac, iz kojeg se pomoću dobivene jednadžbe izračuna koncentracija ukupnih fenola u svakom uzorku. Rezultat se izražava kao mg L^{-1} ekvivalenata galne kiseline (GAE).

Postupak rada

Prethodno pripremljeni uzorci s koncentracijom biljnog materijala od 40 g L^{-1} razrijeđeni su 5 puta. U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 300 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sastojci u odmjernoj tikvici se promiješaju i ostave se da odstoje 5 minuta. Nakon toga dodaje se 1,5 mL natrijevog karbonata te se odmjerna tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Odmjerna tikvica se ostavi na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 2 sata nakon čega se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 760 nm na spektrofotometru Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation). Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorak, ali se umjesto 300 μL uzorka dodaje 300 μL destilirane vode. Svaki uzorak mjeri se u 2 paralele.

Izrada baždarnog pravca

Kako bi se dobila otopina za izradu standardnih otopina u odmjernu tikvicu od 50 mL izvaže se 0,5 g galne kiseline i tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od dobivene otopine naprave se standardne otopine od 100, 150, 200, 250 i 300 mg L^{-1} galne kiseline u odmjernim tikvicama od 50 mL. U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetirano je 300 μL otopine pojedinačne koncentracije te 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode nakon čega se sastojci promiješaju i tikvica se ostavi da odstoje 5 minuta. Nakon toga doda se 1,5 mL natrijevog karbonata te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Postupak se ponovi za svaku standardnu otopinu. Odmjerne tikvice ostave se na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 2 sata te se zatim mjeri apsorbancija na 760 nm pomoću spektrofotometra. Slijepa proba priprema se po istom postupku kao i uzorci, ali se umjesto 300 μL uzorka dodaje 300 μL destilirane vode.

Račun

Iz pravca ovisnosti apsorbancije standardnih otopina galne kiseline o njihovoj koncentraciji dobiven je baždarni pravac te jednadžba pravca iz koje se izračunava koncentracija ukupnih fenola u uzorku:

$$y = 0,0041x + 0,0204 \quad [1]$$

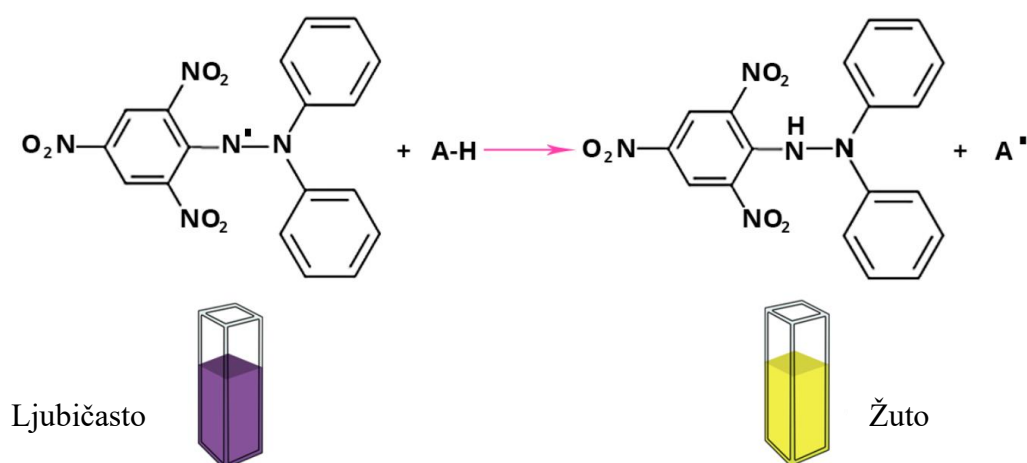
U dobivenoj jednadžbi y je vrijednost apsorbancije izmjerene pri 760 nm, a x je masena koncentracija ukupnih fenola izraženih u mg L^{-1} . Dobiveni rezultati uzoraka s masenom koncentracijom biljnog materijala od 40 g L^{-1} pomnoženi su s 5 s obzirom da se metoda provodila s uzorcima razrijeđenim 5 puta.

3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

3.2.3.1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) metoda

Princip metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti pomoću DPPH metode temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm). U prisutnosti elektron donora-AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (slika 8) (Brand-Williams i sur., 1995).



Slika 8. Reakcija redukcije DPPH radikala (prema Al-Kufaishi i sur., 2020)

Postupak rada

DPPH reagens pripremi se otapanjem 0,03943 grama DPPH s 96 %-tnim etanolom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Od ove se otopine tokom rada pripremi svježa 0,1 mM otopina DPPH reagensa tako da se uzme 0,5 mL originalne otopine i nadopuni se 96 %-tnim etanolom do oznake u tikvici od 50 mL.

U kivetu se odpipetira 2 mL 96 %-tnog etanola, a zatim se doda 200 μ L ispitivanog uzorka koji je prethodno razrijeđen 20 puta te se na kraju doda 2 mL prethodno pripremljene otopine DPPH. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto 200 μ L uzorka dodaje 200 μ L etanola. Sadržaj kivete se promiješa te se ostavi na tamnom mjestu u vremenskom periodu od 30 minuta. Nakon toga se spektrofotometrijski odredi antioksidacijska aktivnost mjerenjem apsorbancije na 517 nm.

Račun

Postotak inhibicije DPPH radikala uzorka računa se prema sljedećoj jednadžbi :

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \cdot 100 \quad [2]$$

A_0 – apsorbancija otopine DPPH radikala

A_t – apsorbancija reakcijske smjese

3.2.3.2. ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metoda

Princip metode

ABTS metoda temelji se na „utišavanju“ plavo-zelenog ABTS radikal-kationa (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Reakcijom ABTS-a s kalijevim persulfatom nastaje kromoforni ABTS• radikal koji daje plavo-zelenu boju otopine s maksimumom apsorpcije pri valnim duljinama od 415, 645, 734 i 815 nm. Antioksidansi dodani u pripremljenu otopinu reduciraju ABTS• čime se gubi obojenje (slika 9). Razina obezbojenja održava postotak inhibicije ABTS• radikala i određuje se kao funkcija koncentracije i vremena te uspoređuje sa standardom ekvivalenta. Metoda je primjenjiva za tvari topljive u vodi i mastima, za čiste tvari i ekstrakte prehrambenih proizvoda (Re i sur., 1999).

3.2.4. Fizikalno-kemijski parametri

3.2.4.1. Određivanje pH vrijednosti

Princip metode

pH vrijednosti uzoraka macerata pelina mjerene su pomoću pH metra Schott CG 842 (Mainz, Njemačka) uranjanjem pH elektrode u uzorke. Prije početka provedbe analize elektroda pH metra kalibrirana je puferom.

3.2.4.2. Određivanje ukupnog ekstrakta

Princip metode

Ukupni ekstrakt jakog alkoholnog pića čini ukupna količina tvari koja ne isparava pri određenim uvjetima. Ekstrakt čine minerali i organska tvar dok se isparavanjem gube voda i hlapive tvari. Ukupni ekstrakt određen je uparavanjem uzorka i sušenjem do konstantne mase. U prethodno izvaganu ohlađenu posudicu dodan je 1 mL macerata pelina koji se zatim suši u sušioniku pri 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja uzorak se prenese u eksikator, a zatim se nakon hlađenja posuda ponovno važe (Lučić, 1987).

Račun

Ukupni ekstrakt računa se pomoću navedene formule:

$$\text{ukupni ekstrakt (g L}^{-1}\text{)} = (M_1 - M_0) \cdot 1000 \cdot V_{\text{uzorka}}^{-1} \quad [4]$$

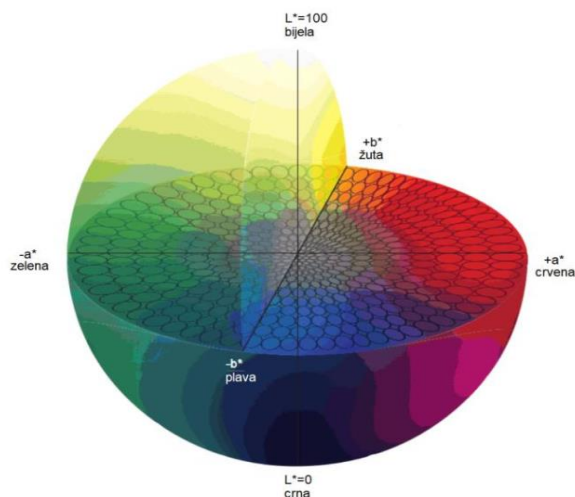
M_1 – masa posudice nakon sušenja (g)

M_0 – masa posudice prije sušenja (g)

3.2.4.3. Određivanje kromatskih parametara

Princip metode

Kromatski parametri dobivenih macerata određeni su spektrofotometrijskom metodom pomoću CIELab sustava. Boja vina ili nekog drugog pića može se opisati pomoću 3 specifična faktora: tonalitet, svjetlina i kromatičnost (slika 10). Tonalitet tj. sama boja je najkarakterističnija osobina, a može biti crvena, žuta, zelena ili plava. Svjetlina je faktor kojim se čini da je neko piće više ili manje blistavo, a kromatičnost ili razina obojenja je povezana s većim ili manjim intenzitetom boje. Kombinacija ova tri faktora omogućava definiranje višestrukih nijansi boje koje vina ili druga pića predstavljaju (OIV, 2022).



Slika 10. CIE Lab prostora boja (prema Mouw, 2018)

Postupak rada

Kromatski parametri dobivenih macerata mjereni su pomoću spektrofotometra Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka) sa izvorom svjetlosti D65. Mjerene su vrijednosti transmitancije svakih 10 nm na području valnih duljina od 380 do 780 nm. U tablici 3 prikazani su kromatski parametri koji su određeni na temelju dobivenih vrijednosti i njihovo značenje. Parametri *C* i *h* određuju ton boje (OIV, 2022).

Tablica 3. Prikaz oznaka kromatskih parametara (OIV, 2022)

Naziv kromatskog parametra	Oznaka	Interval i značenje
Svjetlina	<i>L</i>	0 – 100; 0 – crno, 100 – prozirno
Komponenta crvene/zelene boje	<i>a</i>	Nema intervala >0 crvena boja, <0 zelena boja
Komponenta žute/plave boje	<i>b</i>	Nema intervala >0 žuta boja, <0 plava boja
Zasićenje boje	<i>C</i>	
Kut boje	<i>h</i>	0 – 360°

3.2.5. Statistička obrada podataka

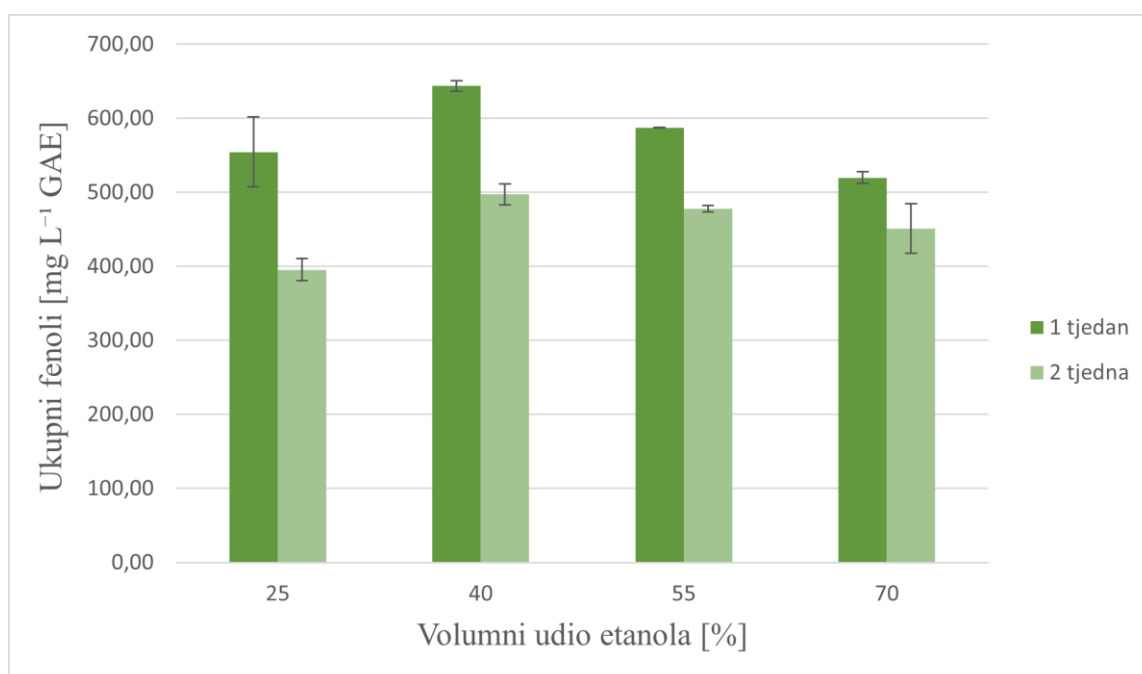
Statistička obrada izmjerenih podataka provedena je pomoću Microsoft Excel (Microsoft 365) softvera. Statistička obrada uključivala je izračun srednje vrijednosti uzoraka ukoliko su mjereni u više paralela te izračun standardne devijacije. Podaci koji su prikazani grafički (u obliku dijagrama) isto su tako obrađeni u Microsoft Excel programu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraženi je utjecaj trajanja maceracije i volumnog udjela etanola (25 %, 40 %, 55 %, 70 % vol.) u vodeno-alkoholnoj bazi na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i fizikalno-kemijske parametre macerata pelina. Postupak maceracije trajao je 2 tjedna, odnosno do ustaljenja sadržaja ukupnih fenolnih spojeva, a svakih 7 dana izuzeti su uzorci macerata na kojima su provedene analize. Osim ukupnih fenola određena je antioksidacijska aktivnost macerata primjenom ABTS i DPPH metode te fizikalno-kemijski parametri: pH vrijednost, ukupni ekstrakt i kromatski parametri.

4.1. Rezultati određivanja količine ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima određen je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Na slici 11 prikazane su prosječne vrijednosti koncentracije ukupnih fenola u dobivenim maceratima tijekom 2 tjedna maceracije.



Slika 9. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima macerata pelina tijekom 2 tjedna maceracije

Koncentracije ukupnih fenola kreću se u rasponu od $395,49 \pm 15,00$ do $643,78 \pm 6,90$ mg L⁻¹ GAE. U svim uzorcima izmjerena je određena koncentracija ukupnih fenola što potvrđuje da se tijekom maceracije polifenoli iz pelina ekstrahiraju u vodeno-etanolnu bazu (Mrvčić i sur., 2012). Prema Lee i sur. (2013), identificirano je 20 polifenolnih spojeva u lišću biljke pelina (*Artemisia absinthium* L.). Salicilna kiselina dominantna je u ekstraktu lišća navedene

biljke, nakon nje slijede miricetin, kava kiselina, galna kiselina i ferulinska kiselina.

Općenito, na koncentraciju fenola ekstrahiranih iz biljke utječe koncentracija bilja, vrijeme maceracije, temperatura te koncentracija etanola u vodeno-etanolnoj bazi.

Vrijeme maceracije bitan je faktor koji utječe na ekstrakciju polifenola, a prema dobivenim rezultatima za koncentraciju bilja od 40 g L⁻¹ dovoljna je kratka maceracija od 1 tjedna. Ukoliko se maceracija produži zabilježena je niža koncentracija fenolnih spojeva u svim uzorcima. Za određivanje približnog vremena završetka maceracije trebalo bi ponoviti mjerenja u kraćim vremenskim razmacima, npr. svaka 2 dana dok se ne zapazi ustaljenje količine ukupnih fenola. Kod uzorka s najnižim udjelom etanola u vodeno-etanolnoj bazi (25 % vol.) zabilježen je najveći pad koncentracije fenolnih spojeva tijekom produžene maceracije (2 tjedna), dok je kod uzoraka sa višim udjelom etanola u vodeno-etanolnoj bazi (55 % i 70 % vol.) zabilježen manji pad koncentracije fenola. Na temelju toga se može zaključiti da je ekstrakcija fenolnih spojeva u uzorku s najnižim udjelom etanola (25 % vol.) tijekom maceracije najkraće trajala, ali moguće je i da je degradacija fenolnih spojeva brža od njihove ekstrakcije pa je zbog toga uočen najveći pad koncentracije fenolnih spojeva u tom uzroku.

Do ekstrakcije fenola tijekom maceracije dolazi zbog difuzije polifenolnih spojeva u odgovarajući ekstrakcijski medij, a sama difuzija može biti ograničavajući faktor uspješnosti ekstrakcije s obzirom da ovisi o veličini čestica, odnosno biljnog materijala. Zbog toga se koristi usitnjeni biljni materijal kako bi se povećala aktivna površina koja dolazi u kontakt s medijem (Jovanović i sur., 2017). Općenito, difuzija je prijenos tvari u plinovima, kapljevinama i čvrstim tvarima, a nastaje zbog razlike u koncentracijama koje se spontanim gibanjem čestica izjednačuju (Hrvatska enciklopedija, 2021). Zbog navedenog razloga, ekstrakcija polifenolnih spojeva brže se odvija na početku maceracije s obzirom na veliku razliku u koncentraciji polifenola u biljnom materijalu u odnosu na onu u vodeno-etanolnoj bazi. Difuzijom se koncentracija polifenola u vodeno-etanolnoj bazi povećava, a samim time i viskoznost medija što usporava proces difuzije. Ekstrakcija traje sve dok se ne postigne ravnoteža u koncentraciji polifenola unutar i izvan biljnog materijala, odnosno vodeno-etanolnog medija.

Sam odabir medija, kao i njegov sastav, jednako je važan faktor koji utječe na maceraciju. U smjesi, jedno otapalo može povećati topljivost polifenola, dok drugo može poboljšati desorpciju. Također, dodatak male količine vode u binarnim smjesama, kao što je vodeno-etanolna baza, ima značajan utjecaj na ekstrakciju jer se na taj način stvara više polarni medij, a pucanje vodikovih veza olakšava ekstrakciju polifenola (Jovanović i sur., 2017).

Prema istraživanju provedenom od Senica i Mikulic-Petkovsek (2019) u kojem je istraživani utjecaj vremena trajanja maceracije na ekstrakciju maksimalne količine fenolnih

spojeva iz 8 različitih biljaka među kojima je i *Artemisia absinthium* L., potvrđeno je da je najveći sadržaj fenola ekstrahirani nakon 7 dana maceracije. Hidroksicimetna kiselina i derivati kava kiseline najviše su pridonijeli sadržaju ukupnih fenola u tom istraživanju. Ove komponente sadrže više hidroksilnih skupina zbog čega se bolje otapaju na početku maceracije.

Zbog polarnosti medija se i očekuje veća koncentracija ukupnih fenola u uzorcima s većim volumnim udjelom etanola u vodeno-etanolnoj bazi s obzirom da do najbolje ekstrakcije fenolnih spojeva dolazi u otapalima koja su manje polarna nego voda (Haminiuk i sur., 2012). Najveća koncentracija fenola izmjerena je u uzorku sa 40 % etanola ($643,78 \pm 6,90 \text{ mg L}^{-1}$ GAE), te zatim sa 55 % etanola ($587,62 \pm 0,43 \text{ mg L}^{-1}$ GAE) što ukazuje da je za ekstrakciju fenolnih spojeva iz pelina optimalan omjer količine vode i etanola približno jednak omjeru 1:1 kao što je to slučaj i s nekim drugim biljkama u proizvodnji macerata (Hanousek Čiča, 2022).

4.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti macerata pelina

Antioksidacijska aktivnost macerata ispitana je primjenom DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metode i ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti macerata pelina DPPH i ABTS metodom

Macerat pelina			Macerat pelina		
1 tjedan			2 tjedna		
Volumni udio etanola (%)	DPPH (% inhibicije)	ABTS (mM Troloxa)	Volumni udio etanola (%)	DPPH (% inhibicije)	ABTS (mM Troloxa)
25	$37,68 \pm 3,49$	$36,74 \pm 0,33$	25	$20,42 \pm 4,98$	$37,14 \pm 0,52$
40	$49,30 \pm 1,49$	$35,97 \pm 0,66$	40	$49,65 \pm 7,97$	$36,34 \pm 0,33$
55	$52,64 \pm 9,21$	$33,75 \pm 3,81$	55	$56,87 \pm 4,73$	$35,64 \pm 0,28$
70	$44,19 \pm 2,74$	$36,87 \pm 0,61$	70	$51,23 \pm 3,24$	$35,97 \pm 0,00$
Standard					
0,025 mM Trolox	$37,26 \pm 1,25$	-	0,025 mM Trolox	$37,26 \pm 1,25$	-

Postotak inhibicije DPPH radikala određen DPPH metodom kreće se u rasponu od $20,42 \pm 4,98$ % do $56,87 \pm 4,73$ %. Rezultati su uspoređeni sa standardnim antioksidacijskim spojem 0,025 mM Trolox-om, koji je uzrokovao $37,26 \pm 1,25$ % inhibicije DPPH radikala. Najveći postotak inhibicije zabilježen DPPH metodom je u uzorku koji sadrži 55 % volumnog udjela etanola nakon 2 tjedna maceracije, dok je najmanji postotak inhibicije zabilježen u uzorku s najmanjim udjelom etanola (25 % vol.). Antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom kreće se u rasponu od $33,75 \pm 3,81$ mM Troloxa do $37,14 \pm 0,52$ mM Troloxa. Najveća antioksidacijska aktivnost određena pomoću ABTS metode zabilježena je u uzorku s najmanjim udjelom etanola (25 % vol.) nakon 2 tjedna maceracije, dok je najmanja koncentracija zabilježena u uzorku s 55 % vol. etanola. Razlike u vrijednostima antioksidacijske aktivnosti mogu se objasniti različitim principima na kojima se pojedine metode temelje (Jukić i sur., 2021). Općenito je, za *in vitro* određivanje antioksidacijske aktivnosti, najbolji pristup korištenje većeg broja razvijenih metoda koje se temelje na različitim mehanizmima zbog velikog broja različitih antioksidacijskih molekula različitih kemijskih struktura te mehanizama njihovog djelovanja na različite ciljne molekule (Jukić i sur., 2021). U istraživanju koje su provele Jukić i sur. (2021) određivao se utjecaj svjetlosti i različitog sastava baze (vodena baza, baza s 30 %, 50 % i 70 % vol. etanola) u kojoj se provodila ekstrakcija biljke *Achillea millefolium* na količinu ukupnih fenola, flavonoida te antioksidacijsku aktivnost tijekom 12, odnosno 24 sata. Primijenjene su FRAP i DPPH metode, te su isto tako dobivene vrijednosti bile različite i nije bilo moguće donijeti konkretan zaključak. Međutim, u uzorku koji je sadržavao 50 % etanola izmjerena je i najveća koncentracija ukupnih fenola, a samim time i antioksidacijska aktivnost. Isto tako, u svim analiziranim uzorcima u tom istraživanju, zabilježena je određena antioksidacijska aktivnost, što dokazuje da su prisutni biološki aktivni spojevi.

Kada se uzmu u obzir rezultati obje korištene metode u ovom radu, može se zapaziti da je najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena u uzorcima sa 40 i 55 % volumnog udjela etanola. Nadalje, može se zaključiti da sa povećanjem količine ekstrahiranih fenolnih spojeva dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti macerata pelina te samim time da su za antioksidacijsku aktivnost macerata pelina odgovorni fenolni spojevi. S druge strane, antioksidacijska aktivnost macerata pelina ne može se pripisati samo fenolnim spojevima već je ona rezultat sinergističkog učinka svih ekstrahiranih biološki aktivnih spojeva pelina.

4.3. Rezultati određivanja fizikalno-kemijskih parametara macerata pelina

4.3.1. Rezultati pH vrijednosti macerata pelina

pH vrijednosti uzoraka izmjerene su pomoću pH metra uranjanjem pH elektrode u uzorke te su dobivene vrijednosti prikazane u tablici 5.

Tablica 5. pH vrijednosti dobivenih macerata pelina

1. tjedan		2. tjedan	
Volumni udio etanola (%)	pH	Volumni udio etanola (%)	pH
25	5,84	25	5,70
40	6,00	40	5,96
55	6,15	55	6,12
70	6,19	70	6,20

pH vrijednosti uzoraka nakon 1 tjedna više su nego nakon 2 tjedna maceracije što ukazuje da se ekstrakcijom spojeva iz biljnog materijala pH uzoraka mijenja. Isto tako je najniži pH zabilježen u uzorcima s najnižim udjelom etanola (25 % vol.), te pH raste s porastom volumnog udjela etanola u uzorku. Veći volumni udio vode prema tome, stvara kiseliji medij dok veći volumni udio etanola stvara neutralniji medij što ukazuje na važnost sastava medija u kojem se provodi maceracija za ekstrakciju određene vrste spojeva kao i njihove količine (Hanousek Čiča, 2022). U radu Hanousek Čiča i sur. (2022) u kojem su se pratili parametri maceracije s ciljem proizvodnje macerata biske izmjerene pH vrijednosti slažu se s dobivenim rezultatima. pH vrijednosti uzoraka s najmanjim udjelom etanola bile su niže te se njihova vrijednost povećavala s povećanjem volumnog udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi.

4.3.2. Rezultati određivanja ukupnog ekstrakta macerata pelina

Dobivene vrijednosti ukupnog ekstrakta u uzorcima macerata pelina prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Ukupni ekstrakt macerata pelina

1. tjedan		2. tjedan	
Volumni udio etanola (%)	Ukupni ekstrakt (g L ⁻¹)	Volumni udio etanola (%)	Ukupni ekstrakt (g L ⁻¹)
25	8,5	25	8,7
40	8,6	40	8,9
55	9,5	55	9,2
70	7,1	70	7,7

Količina ukupnog ekstrakta povećala se u svim uzorcima nakon 2 tjedna maceracije, osim u uzorku u kojem se ekstrakcija provodila u bazi s volumnim udjelom od 55 % etanola, gdje se količina smanjila nakon 2 tjedna maceracije. Povećanje količine ukupnog ekstrakta očekivano je s obzirom da se kroz duži vremenski period više komponenata ekstrahira. Najveća količina ukupnog ekstrakta (9,5 g L⁻¹) izmjerena je u uzorku s 55 %-tnim udjelom etanola nakon 1 tjedna maceracije. Najmanja količina ukupnog ekstrakta (7,1 g L⁻¹) izmjerena je u uzorku s najvećim udjelom etanola u vodeno-etanolnoj bazi (70 % vol.). Dobiveni rezultati ukazuju da na količinu ukupnog ekstrakta koji se ekstrahira utječe sastav baze u kojoj se provodi ekstrakcija. Ugljikohidrati sadrže hidroksilne skupine, a ugljikohidrati sa 5 ili 6 hidroksilnih skupina bolje se otapaju u vodi nego u etanolu. Prema tome visoka koncentracija etanola smanjuje topljivost ugljikohidrata te time i količinu ukupnog ekstrakta (Hanousek Čiča i sur., 2022).

4.3.3. Rezultati kromatskih parametara macerata pelina

Kromatski parametri određeni su spektrofotometrijski prema CIELab metodologiji. Izmjerene vrijednosti kromatskih parametara u uzorcima nakon 1 tjedna maceracije prikazane su u tablici 7, a nakon 2 tjedna maceracije u tablici 8.

Tablica 7. Kromatski parametri macerata pelina nakon 1 tjedna maceracije

Oznaka	25 % vol.	40 % vol.	55 % vol.	70 % vol.
<i>L</i>	84,6829	77,7267	66,5738	58,7816
<i>a</i>	2,3728	2,8350	2,3997	1,0188
<i>b</i>	55,0680	67,8390	72,9709	83,5272
<i>C</i>	55,1191	67,8982	73,0103	85,5334
<i>h</i>	1,5277	1,5290	1,5379	1,5586

Tablica 8. Kromatski parametri macerata pelina nakon 2 tjedna maceracije

Oznaka	25 % vol.	40 % vol.	55 % vol.	70 % vol.
<i>L</i>	84,5232	75,1309	64,7093	57,0824
<i>a</i>	2,8292	4,8717	4,5177	4,5969
<i>b</i>	54,9475	66,9511	68,5412	78,0950
<i>C</i>	55,0203	67,1281	68,6899	78,2286
<i>h</i>	1,5194	1,4982	1,5050	1,5123

Oznaka *L* označava svjetlinu ekstrakta, vrijednost 0 ukazuje na crno dok vrijednost 100 prozirno. Prema tome, vidljivo je da ekstrakti s nižim volumnim udjelom etanola (25 % vol., 40 % vol.) pokazuju više vrijednost parametra *L*, odnosno više su bistri, dok ekstrakti s višim volumnim udjelom etanola (55 % vol., 70 % vol.) pokazuju niže vrijednosti parametra *L*, odnosno manju bistroću. Zapaženo je i da nakon 2 tjedna maceracije svi uzorci pokazuju blagi pad vrijednosti parametra *L*, odnosno smanjenje bistroće uzoraka. Naime, s povećanjem udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi dolazi do povećanja količine komponenti koje su topljive u etanolu čime se smanjuje prozirnost uzorka (Hanousek Čiča i sur., 2022). Parametri *a* i *b* pokazuju komponentu crvene/zelene boje, odnosno žute/plave boje. U svim uzorcima prisutna je komponenta crvene boje (parametar $a > 0$), međutim nakon 2 tjedna maceracije došlo je do porasta vrijednosti parametra *a*, odnosno povećanja količine komponenata crvene boje. Parametar *b* ukazuje da je u svim uzorcima prisutna komponenta žute boje, ali se vrijednost parametra smanjuje nakon 2 tjedna, odnosno prisutnost komponenata žute boje. Isto tako treba istaknuti da u uzorcima prevladavaju komponente žute boje s obzirom da su vrijednosti

parametra b znatno veće od onih parametra a . Parametar C pokazuje vrijednost zasićenja boje te se ta vrijednost povećava s povećanjem volumnog udjela etanola, međutim isto tako dolazi do blagog pada zasićenja boje nakon 2 tjedna maceracije. Parametar h ukazuje na kut boje u CIELab prostoru boja. U istraživanju Hanousek Čiča i sur. (2020) u kojem su promatrani fizikalno-kemijski parametri koji utječu na maceraciju rogača dobiveni su vrlo slični rezultati. Naime, i u uzorcima u kojima se provodila maceracija rogača s dužim vremenom maceracije se smanjuje prozirnost uzoraka, a prisutne komponente boje na kraju maceracije pripadaju žutim i crvenim nijansama. Jedina zapažena razlika je da su uzorci rogača na početku maceracije sadržavali komponente zelene boje ($a < 0$) dok su uzorci pelina sadržavali komponente crvene boje i na početku maceracije ($a > 0$).

5. ZAKLJUČCI

1. Trajanje maceracije i volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi utječu na ekstrakciju ukupnih fenola u maceratima pelina. Najveća količina ukupnih fenola ($643,78 \pm 6,90 \text{ mg L}^{-1}$ GAE) izmjerena je u uzorku s 40 % volumnog udjela etanola. Ekstrakcija fenola tijekom maceracije pelina završila je nakon 1 tjedna maceracije.

2. Antioksidacijska aktivnost macerata pelina ovisi o količini ekstrahiranih fenolnih spojeva, a s povećanjem količine ekstrahiranih fenolnih spojeva povećava se antioksidacijska aktivnost uzoraka. Antioksidacijska aktivnost macerata pelina rezultat je sinergističkog učinka fenolnih spojeva i svih ostalih ekstrahiranih biološki aktivnih spojeva pelina.

3. pH vrijednosti macerata pelina ovise o volumnom udjelu etanola u vodeno-etanolnoj bazi i trajanju maceracije. S produljenjem trajanja maceracije dolazi do blagog pada pH vrijednosti.

4. Trajanje maceracije i volumni udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi utječu na koncentraciju ukupnog ekstrakta u uzorku. Najveća koncentracija ukupnog ekstrakta izmjerena je u uzorku s 55 % volumnog udjela etanola. S produljenjem trajanja maceracije povećava se i koncentracija ukupnog ekstrakta u uzorku.

5. Vrijednost kromatskih parametara ovisi o trajanju maceracije i volumnom udjelu etanola u vodeno-etanolnoj bazi. U svim uzorcima zabilježena je prisutnost žute i crvene komponente boje, te smanjenje bistroće (*L*) uzoraka s povećanjem udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi. Određivanje kromatskih parametara bitno je kako bi se osigurala željena boja i bistroća konačnog proizvoda što naposljetku utječe i na želju za konzumacijom takvih proizvoda od strane potrošača i na prodaju proizvoda.

6. Preporučeni optimalni parametri maceracije pelina (40 g L^{-1}) su trajanje maceracije 1 tjedan i 40 % vol. etanola u vodeno-etanolnoj bazi.

6. POPIS LITERATURE

Al-Kufaishi AMA, Al-Mashhedy LAM, Al-Rubaie BJ (2020) Estimation of Antioxidants Activity Through DPPH Inhibition Levels in Patients with Chronic HPV 16 Cervicitis. *Med Legal Update* **20**, 598-602. <https://doi.org/10.37506/mlu.v20i3.1465>

Marjan A (2010) *Artemisia absinthium* L. - Observation.org. <https://observation.org/photos/1532327/> Pristupljeno 18. lipnja 2023.

Becker MM, Nunes GS, Ribeiro DB, Silva FEPS, Catanante G, Marty JL (2019) Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *J Braz Chem Soc* **30**, 1108-1114. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>

Bhat RR, Rehman MU, Shabir A, Rahman Mir MU, Ahmad A, Khan R, i sur. (2019) Chemical Composition and Biological Uses of *Artemisia absinthium* (Wormwood). *Plant Human Health* **3**, 37-63. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04408-4_3

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* **28**, 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Grba S, Stehlik-Tomas V (2010) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, Plejada d.o.o., Zagreb, str. 229-264.

Haminiuk CWI, Plata-Oviedo MSV, de Mattos G, Carpes ST, Branco IG (2012) Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* in different solvents. *J Food Sci Technol* **51**, 2862–2866. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0759-z>

Hanousek Čiča K (2022) Fitokemijski profil, funkcionalna svojstva i fizikalno-kemijski parametri tradicionalne istarske travarice biske (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hanousek Čiča K, Lukin P, Derewiaka D, Mrvčić J, Stanzer D (2022) Chemical Composition, Physical Properties, and Aroma Profile of Ethanol Macerates of Mistletoe (*Viscum album*). *Beverages* **8**, 46. <https://doi.org/10.3390/beverages8030046>

Hanousek Čiča K, Mrvčić J, Srećec S, Filipan K, Blažić M, Stanzer D (2020) Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Sci Nutr* **8**, 942-954. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1374>

Hoffmann D (2003) Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine, Simon and Schuster, New York.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=15048> Pristupljeno 18. kolovoza 2023.

Jovanović A, Petrović P, Đorđević V, Zdunić G, Šavikin K, Bugarski B (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine* **37**, 45-49. <http://dx.doi.org/10.5937/leksir1737045J>

Jukić H, Dedić S, Džaferović A (2022) Determination of antioxidant activity and phenolic content in aqueous and ethanol-aqueous extracts (*Achillea millefolium*). U: Proceedings of the 13th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH, Osijek, str. 79-88.

Kolak I, Carović K, Šatović Z, Rozić I (2004) GORSKI PELIN (*Artemisia absinthium* L.). *Sjemenarstvo* **21**, 275-282. <https://hrcak.srce.hr/file/247832>

Koyuncu I (2018) Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cell Mol Biol* **6**, 25-34. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.3.5>

Kurtagić H (2017) POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS IN HONEY. *Hrana u zdravlju i bolesti*, **6**, 28-35. <https://hrcak.srce.hr/file/269690>

Lachenmeier DW (2007) Assessing the authenticity of absinthe using sensory evaluation and HPTLC analysis of the bitter principle absinthin. *Food Res Int* **40**, 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.09.002>

Lee YJ, Thiruvengadam M, Chung IM, Nagella P (2013) Polyphenol composition and antioxidant activity from the vegetable plant '*Artemisia absinthium*' L. *Aust J Crop Sci* **7**, 1921-1926. <https://search.informit.org/doi/epdf/10.3316/informit.669038022011805>

Lučić R (1987) *Proizvodnja jakih alkoholnih pića*, Nolit, Beograd, str. 423-424.

Mouw T (2018) Tolerancing Part 3: Color Space vs. Color Tolerance-X-rite. <https://www.xrite.com/blog/tolerancing-part-3> Pristupljeno 25. lipnja 2023.

Mrvčić J, Posavec S, Kazazic S, Stanzer D, Peša A, Stehlik-Tomas V (2012) Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croat J Food Sci Technol.* **4**, 102-111. <https://hrcak.srce.hr/99617>

OIV – Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis (2022) Determination of chromatic characteristics according to CIELab (OIV-MA-AS2-11). OIV – International Organisation of Vine and Wine, Pariz.

Padosch SA, Lachenmeier DW, Kröner LU (2006) Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact. *Subst Abuse Treat Prev Policy* **1**, 14. <https://doi.org/10.1186/1747-597X-1-14>

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* **5**, 1-15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28620474/>

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231– 1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Rocha LD, Costa Monteiro M, Teodoro AJ (2012) Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids- A Review. *Cancer and clinical oncology* **1**, 109. <http://dx.doi.org/10.5539/cco.v1n2p109>

Senica M, Mikulić-Petkovsek M (2019) Changes in beneficial bioactive compounds in eight traditional herbal liqueurs during a one-month maceration process. *J Sci Food Agric* **100**, 343–353. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10044>

Sharifi-Rad M, Lankatillake C, Dias DA, Docea AO, Mahomoodally MF, Lobine D, i sur. (2020) Impact of Natural Compounds on Neurodegenerative Disorders: From Preclinical to Pharmacotherapeutics. *J Clin Med* **9**, 1061. <https://pub med.ncbi.nlm.nih.gov/32276438/>

Singh NP, Lai H (2001) Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci* **70**, 49-56. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01372-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01372-8)

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J of Enol Vitic* **16**, 144 – 158. <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>

Szopa A, Pajor J, Klin P, Rzepiela A, Elansary HO, Al-Mana FA, i sur. (2020) *Artemisia absinthium* L.-Importance in the History of Medicine, the Latest Advances in Phytochemistry and Therapeutical, Cosmetological and Culinary Uses. *Plants* **9**, 1063. <https://doi.org/10.3390/plants9091063>

Tehnička dokumentacija Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (2016) Hrvatski pelinkovac. https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/zemljopisno_podrijetlo/2016-11-Hrvatski_pelinkovac-konacno.docx Pristupljeno 2.srpnja 2023.

Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i vijeća o definiranju, opisivanju, prezentiranju i označavanju jakih alkoholnih pića, upotrebi naziva jakih alkoholnih pića u prezentiranju i označavanju drugih prehrambenih proizvoda, zaštiti oznaka zemljopisnog podrijetla za jaka alkoholna pića, upotrebi etilnog alkohola i destilata poljoprivrednog podrijetla u alkoholnim pićima te stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br.110/2008. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0787&from=de> Pristupljeno 8.srpnja 2023.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M (2012) Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: Venketeshwer Rao A (ured.) Phytochemicals as nutraceuticals – global approaches to their role in nutrition and health., InTech, Rijeka, str. 155-158.

Izjava o izvornosti

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

Leonarda Strmo

Vlastoručni potpis