

Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz lavande

Butorac, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:316233>

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

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

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UTJECAJ PRIMJENJENE METODE
EKSTRAKCIJE NA IZOLACIJU BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI IZ LAVANDE

ZAVRŠNI RAD

VALENTINA BUTORAC

Matični broj:1442

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

UTJECAJ PRIMJENJENE METODE
EKSTRAKCIJE NA IZOLACIJU BIOAKTIVNIH
KOMPONENTI IZ LAVANDE

ZAVRŠNI RAD

VALENTINA BUTORAC

Matični broj: 1442

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
COURSE: FOOD TECHNOLOGY

**INFLUENCE OF THE APPLIED EXTRACTION
METHOD ON ISOLATION OF BIOACTIVE
COMPONENTS FROM LAVENDER**

BACHELOR THESIS

VALENTINA BUTORAC

Parent number: 1442

Split, October 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Stručni studij kemijske tehnologije; smjer Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

UTJECAJ PRIMJENJENE METODE EKSTRAKCIJE NA IZOLACIJU BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ LAVANDE

Valentina Butorac, 1442

Sažetak:

Lavanda je mediteranska aromatična biljka koja se zbog atraktivnog izgleda i ugodnog, intenzivnog mirisa najčešće koristi u dekoracijske svrhe ili u pripravi kozmetičkih preparata. Cilj ovog istraživanja je bio istražiti najpogodniju metodu i uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz lavande te odrediti antioksidacijski potencijal pripremljenih ekstrakata. U istraživanju su korištena dva ekstrakcijska otapala, voda i 80%-tni etanol, a varijacije ekstrakcija su uključivale različito vrijeme ekstrakcije (30, 60 i 90 minuta) u ultrazvučnoj kupelji. Osim toga testirana je i učinkovitost ekstrakcije pri različitim temperaturama (sobnoj temperaturi i pri 60 °C), utjecaj miješanja kao i maceracija u trajanju od 72 h. Sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima lavande je određen Folin-Ciocalteu metodom, dok je antioksidacijska aktivnost testirana FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) i DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) metodom. Najveća količina fenola izmjerena je u vodenom ekstraktu pripremljenom djelovanjem ultrazvuka tijekom 90 min pri temperaturi od 60 °C (4873 mg GAE/L), dok je najbolju redukcijsku aktivnost pokazao etanolni ekstrakt pripremljen maceracijom pri sobnoj temperaturi tijekom 72 h uz prethodno miješanje tijekom 30 minuta, a antiradikalnu aktivnost etanolni ekstrakt pripremljen djelovanjem ultrazvuka tijekom 90 min pri temperaturi od 60 °C.

Ključne riječi: lavanda, ekstrakcija, fenolni spojevi, FRAP, DPPH.

Rad sadrži: 36 stranica, 10 slika, 1 tablicu, 27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek - član
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - mentor

Datum obrane: 24. listopada 2018. g.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Professional study of Chemical Technology; Course: Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 3
Mentor: Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

INFLUENCE OF THE APPLIED EXTRACTION METHOD ON ISOLATION OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM LAVENDER

Valentina Butorac, 1442

Abstract:

Lavender is an Mediterranean aromatic plant, which, due to its look and pleasant and intensive smell, is frequently used as an ornament or as an ingredient of the cosmetic products. The aim of this study was to find the best extraction method and conditions for isolation of phenolic compounds from lavender and to test the antioxidant activity of the extracts. For that purpose, two different solvents were used, water and 80% ethanol, and extraction procedures also included variations in the duration (30, 60 and 90 minutes) of treatments using ultrasonic bath. Also, the effectiveness of the process at different temperatures (room temperature and at 60 °C), the influence of the shaking as well as the maceration during 72 h was also investigated. The total phenolic content in the prepared extracts was determined by Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant activity was tested using FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) and DPPH (2,2-diphenyl-1 picril hydrazyl) assay. The highest concentration of phenolics was detected in water extract prepared by ultrasound during 90 minutes at 60 °C (4873 mg GAE/L), while the best reducing activity was obtained for ethanolic extract prepared by maceration during 72 h with additional stirring during 30 minutes, and antiradical activity was the highest for ethanolic extract prepared using ultrasound during 90 minutes at 60 °C.

Keywords: lavender, extraction, phenolic compounds, FRAP, DPPH.

Thesis contains: 36 pages, 10 figures, 1 tables, 27 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Danijela Skroza, Assist. Prof.
2. Ph. D. Mario Nikola Mužek, Assist. Prof.
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assist. Prof.

Defence date: October 24, 2108

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od siječnja do listopada 2018. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada je bio istražiti utjecaj različitih čimbenika ekstrakcije (otapalo, temperatura, vrijeme trajanja procesa, miješanje i maceracija tijekom 72 h), utječu na udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost pripremljenih ekstrakata lavande.

SAŽETAK

Lavanda je mediteranska aromatična biljka koja se zbog atraktivnog izgleda i ugodnog, intenzivnog mirisa najčešće koristi u dekoracijske svrhe ili u pripravi kozmetičkih preparata. Cilj ovog istraživanja je bio istražiti najpogodniju metodu i uvjete ekstrakcije fenolnih spojeva iz lavande te odrediti antioksidacijski potencijal pripremljenih ekstrakata. U istraživanju su korištena dva ekstrakcijska otapala, voda i 80 %-tni etanol, a varijacije ekstrakcija su uključivale različito vrijeme ekstrakcije (30, 60 i 90 minuta) u ultrazvučnoj kupelji. Osim toga, testirana je i učinkovitost ekstrakcije pri različitim temperaturama (sobnoj temperaturi i pri 60 °C), utjecaj miješanja kao i maceracija u trajanju od 72 h. Sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima lavande je određen Folin-Ciocalteu metodom, dok je antioksidacijska aktivnost testirana FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) i DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) metodom. Najveća količina fenola izmjerena je u vodenom ekstraktu pripremljenom djelovanjem ultrazvuka tijekom 90 min pri temperaturi od 60 °C (4873 mg GAE/L), dok je najbolju redukcijsku aktivnost pokazao etanolni ekstrakt pripremljen maceracijom pri sobnoj temperaturi tijekom 72 h uz prethodno miješanje tijekom 30 minuta, a antiradikalnu aktivnost etanolni ekstrakt pripremljen djelovanjem ultrazvuka tijekom 90 min pri temperaturi od 60 °C.

Ključne riječi: lavanda, ekstrakcija, fenolni spojevi, FRAP, DPPH.

ABSTRACT

Lavender is an Mediterranean aromatic plant, which, due to its look and pleasant and intensive smell, is frequently used as an ornament or as an ingredient of the cosmetic products. The aim of this study was to find the best extraction method and conditions for isolation of phenolic compounds from lavender and to test the antioxidant activity of the extracts. For that purpose, two different solvents were used, water and 80% ethanol, and extraction procedures also included variations in the duration (30, 60 i 90 minutes) of treatments using ultrasonic bath. Also, the effectiveness of the process at different temperatures (room temperature and at 60 °C), the influence of the shaking as well as the maceration during 72 h was also investigated. The total phenolic content in the prepared extracts was determined by Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant activity was tested using FRAP (*Ferric Reducing/ Antioxidant Power*) and DPPH (2,2-difenil-1 picril-hydrazyl) assay. The highest concentration of phenolics was detected in water extract prepared by ultrasound during 90 minutes at 60 °C (4873 mg GAE/L), while the best reducing activity was obtained for ethanolic extract prepared by maceration during 72 h with additional stirring during 30 minutes, and antiradical activity was the highest for ethanolic extract prepared using ultrasound during 90 minutes at 60 °C.

Keywords: lavender, extraction, phenolic compounds, FRAP, DPPH.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| Uvod..... | 1 |
| 1. Opći dio | 2 |
| 1.1. Ekstrakcija..... | 3 |
| 1.1.1. Metode ekstrakcije | 4 |
| 1.1.1.1. Ekstrakcija kruto-tekuće | 4 |
| 1.1.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće | 4 |
| 1.1.1.3. Maceracija | 4 |
| 1.1.1.4. Ostali pripravci i postupci | 5 |
| 1.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija..... | 5 |
| 1.1.3. Ekstrakti | 6 |
| 1.1.3.1. Podjela ekstrakata prema konzistenciji | 6 |
| 1.1.3.2. Podjela ekstrakata prema tipu korištenog otapala | 7 |
| 1.1.3.3. Podjela ekstrakata prema primjeni | 7 |
| 1.2. Slobodni radikali | 8 |
| 1.3. Antioksidansi..... | 8 |
| 1.4. Fenolni spojevi | 9 |
| 1.5. Ljekovito bilje | 10 |
| 1.5.1. Aktivne tvari biljaka | 10 |
| 1.6. Skupljanje, sušenje i čuvanje ljekovitog bilja | 11 |
| 1.7. Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>) | 12 |
| 1.7.1. Opis biljke..... | 13 |
| 1.7.2. Stanište i rasprostranjenost | 14 |
| 1.7.3. Kemijski sastav lavande i eteričnog ulja lavande | 14 |
| 1.7.4. Djelovanje i upotreba lavande | 15 |
| 2. Eksperimentalni dio..... | 16 |
| 2.1. Kemikalije i uređaji..... | 17 |
| 2.2. Biljni materijal | 17 |
| 2.3. Priprema ekstrakata..... | 17 |
| 2.4. Metoda određivanja ukupnih fenola..... | 18 |
| 2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP (engl. <i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i>) metodom | 19 |
| 2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom | 20 |
| 3. Rezultati i rasprava | 22 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.1. | Rezultati određivanja sadržaja fenola | 24 |
| 3.2. | Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti | 27 |
| 3.2.1. | Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom | 27 |
| 3.2.2. | Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom..... | 30 |
| 4. | Zaključak | 32 |
| 5. | Literatura..... | 34 |

UVOD

Primjena ljekovitog bilja u narodnoj medicini je stara koliko i samo čovječanstvo. U početku su se biljke koristile samo za ishranu i kao lijekovi ili pomoćne ljekovite tvari u obliku droga, čajeva i sirupa, a danas je njihova primjena puno opširnija. Tako se recimo biljke koriste kao konzervansi i aditivi u prehrambenoj industriji, za proizvodnju prirodnih herbicida (sredstava za zaštitu bilja), sredstava za bojenje, za proizvodnju parfema i alkoholnih pića pa mnoge industrijske grane poput farmaceutske, konditorske, kozmetičke i prehrambene koriste biljke kao polazne sirovine za dobivanje finalnog proizvoda. Lavanda je aromatična biljka porijeklom s Mediterana koja se najviše koristi u kućanstvu, kulinarstvu, narodnoj medicini, kozmetičkoj industriji, aromaterapiji, a u zadnje vrijeme i u farmaceutskoj industriji. Zbog skromnih uvjeta po pitanju kvalitete tla, uzgoja i ekonomske isplativosti broj uzgajivača ove biljke je u stalnom porastu kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj. Čovjekova želja da se vrati prirodnim proizvodima i alternativnim metodama liječenja je onemogućila da sintetičke tvari i brzi razvoj kemijskih industrija potisnu uzgoj i primjenu ljekovitog bilja u svakodnevnom životu.

1. Opći dio

1.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija se definira kao proces izdvajanja neke tvari iz čvrste (krute) ili tekuće smjese korištenjem prikladnog otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese (1). Ukoliko se otopina neke tvari u homogenoj smjesi dovede u kontakt s drugim otapalom, otopljena tvar će se zbog različite topljivosti raspodijeliti između te dvije otopine (2).

Prema agregatnom stanju faza razlikuju se dva tipa ekstrakcija; ekstrakcija čvrsto-tekuće (izluživanje) i ekstrakcija tekuće-tekuće (1). Ekstrakcijom je moguće izolirati i koncentrirati aktivne komponente iz svih dijelova biljaka ili životinjskih tkiva, što omogućuje njihovo daljnje korištenje (3). Učinak ekstrakcije je bolji ukoliko se ona provodi u više navrata s manjom količinom otapala (2). Procesi ekstrakcije mogu se provoditi diskontinuirano (šaržno), pseudokontinuirano ili kontinuirano, a glavna razlika između ovih procesa je u tome što se kod diskontinuiranih procesa koristi samo jedan uređaj za ekstrakciju (tzv. difuzer), dok se kod kontinuiranih procesa koristi više uređaja za ekstrakciju koji su obično međusobno povezani (1). Ekstrakcijska otapala koja se najčešće koriste su voda (najpolarnija), etanol, metanol, aceton, etil-acetat, biljna ulja, *n*-heksan (slabo polaran), a izbor otapala za ekstrakciju ovisi o polarnosti aktivne komponente koja se želi izolirati (4). Glavne odlike potencijalnih otapala koja se koriste su da ista u prvom redu moraju biti polarna, moraju imati nisku točku ključanja radi lakšeg odvajanja, moraju biti relativno inertna odnosno ne smiju reagirati s ekstraktom niti se razgrađivati, moraju imati niski viskozitet, moraju biti stabilna na djelovanje topline, kisika i svjetla, praktična i sigurna za upotrebu (5).

1.1.1. Metode ekstrakcije

1.1.1.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Ekstrakcija kruto-tekuće je difuzijski proces tijekom kojeg jedna ili više komponenti, na temelju razlike u topljivosti, iz čvrstog materijala prelazi/prelaze u tekuće otapalo. Proces se općenito sastoji od tri faze. U prvoj fazi dolazi do kontakta krutog materijala i otapala pri čemu otapalo prodire kroz pore krutog materijala. Zatim se u drugoj fazi topiva tvar „lijepi“ na površinu čestica otapala (početak difundacije), dok u konačnici u trećoj fazi topiva tvar u potpunosti difundira u otapalo (6).

1.1.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Kod ovog tipa ekstrakcije postoje dvije tekuće faze, i to otopinu koja sadrži tvar koju se želi izolirati i otapalo koje je također u tekućem stanju. Kako bi došlo do ekstrakcije željene komponente jedna faza se mora raspršiti u drugoj pa se ovaj tip ekstrakcija najčešće primjenjuje kad je nemoguće koristiti postupak destilacije, npr. za azeotropne smjese ili kod termolabilnih sastojaka (7).

1.1.1.3. Maceracija

Maceracija je jedna od najstarijih i najjednostavnijih metoda ekstrakcije kod koje se kruta tvar stavlja u zatvorenu posudu zajedno s otapalom. Ovako pripremljena smjesa se ostavi stajati na sobnoj temperaturi najkraće 3 dana uz povremeno miješanje. Nakon završene maceracije, postupcima dekantacije ili cijeđenja se razdvoji kruti dio od tekućeg, odnosno ekstrakta. Kruti ostatak obično ide na prešanje, a tekući na izbistravanje ili filtraciju. Klasična maceracija se izvodi korištenjem hladnih otapala što je velika prednost ovog postupka jer se u dobivenom maceratu na taj način zadrži veliki broj aktivnih tvari. Nedostatak je, naravno, dugotrajnost procesa.

Infuzija je poseban oblik postupka maceracije gdje se materijal tretira kratkotrajno s hladnom ili kipućom vodom pri čemu nastaje otopina lako topivih sastojaka iz krute droge (3). Digestija je oblik maceracije kod koje se tijekom procesa ekstrakcije primjenjuje blago zagrijavanje (do 50 °C) pa se stoga uglavnom koristi kod izolacije termolabilnih komponenta (6).

1.1.1.4. Ostali pripravci i postupci

Dekokt je pripravak koji se dobiva procesom ekstrakcije kod kojeg se kruta droga kuha u određenom volumenu vode i određeno vrijeme. Nakon kuhanja smjesa se ohladi, procijedi ili filtrira. Ova metoda se koristi za izolaciju izrazito termostabilnih tvari topivih u vodi (3).

Perkolacija je proces kod kojeg se vrši kontinuirana ekstrakcija protjecanjem otapala kroz stub droge u perkolatoru. Prije početka perkolacije kruta droga se namače prikladnom količinom otapala i stoji 4 sata u zatvorenoj posudi. Nakon toga se stavlja u perkolator u obliku plitkog sloja, a perkolator se zatvara i započinje proces maceracije koji traje 24 h. Nakon završenog postupka iz perkolatora se ispušta ekstrakt u određenom volumenu, a to je $\frac{3}{4}$ volumena menzure koja se koristi u perkolaciji (3,6).

1.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija je oblik ekstrakcije kod kojeg se koristi ultrazvuk frekvencija u rasponu od 20-2000 kHz. Primjenom ultrazvuka dolazi do povećanja propusnosti staničnih zidova i pojave kavitacije koja dovodi do bubrenja stanice i pucanja stanične stijenke čime se znatno ubrzavaju procesi difuzije i omogućeno je jednostavnije istjecanje sastojaka iz stanice. Ova metoda osim što je veoma učinkovita i brza, omogućava korištenje male količine otapala i provođenje ekstrakcije pri nižim temperaturama. Da bi ekstrakcija bila maksimalno uspješna potrebno je optimizirati temperaturu procesa, snagu ultrazvuka te pravilno odabrati otapalo. Ultrazvučna ekstrakcija se obično provodi u ultrazvučnim kupeljima ili pomoću ultrazvučne sonde.

Ovisno o jakosti frekvencije koja se koristi razlikuje se ultrazvuk niskog intenziteta koji djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više, i ultrazvuk visokog intenziteta koji djeluje u frekvencijskom rasponu od 20 do 100 kHz. Ultrazvuk niskog kapaciteta ne uzrokuje nikakve fizičke ni kemijske promjene u mediju na koji se primjenjuje pa se često koristi kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, za mjerenja teksture, sastava, viskoznosti, brzine protjecanja, koncentracije tvari u hrani itd. Ultrazvuk visokog kapaciteta dovodi do fizičkih i/ili kemijskih promjena u materijalu na koji se primjenjuje pa se najčešće koristi u procesima kao što su sušenje, za otplinjavanje i homogenizaciju tekućina, destilaciju, sterilizaciju itd (5).

1.1.3. Ekstrakti

Ekstrakt se definira kao iscrpina koja se dobiva postupkom ekstrakcije biljne ili životinjske droge (8). Ekstrakti se dijele u više skupina ovisno o zajedničkom selektivnom svojstvu.

1.1.3.1. Podjela ekstrakata prema konzistenciji

Prema konzistenciji ekstrakti se dijele u tri glavne skupine (6) :

- tekući ekstrakti i tinkture
- polukruti ili polučvrsti ekstrakti- meki ekstrakti
- kruti ili čvrsti ekstrakti- suhi ekstrakti.

Tekući ekstrakti su pri sobnoj temperaturi tekućine i kod njih jedan dio mase ekstrakta odgovara jednom dijelu mase suhe biljne droge upotrijebljene za ekstrakciju.

Tinkture su također tekući preparati koji se pripremaju ekstrakcijom osušenih biljnih droga pri čemu se kao ekstrakcijsko otapalo koristi alkohol. Meki ekstrakti su preparati koji imaju polučvrstu konzistenciju, a dobivaju se djelomičnim ili potpunim uparavanjem otapala koje se koristi pri ekstrakciji.

Suhi ekstrakti su kruti preparati koji se dobivaju potpunim uparavanjem otapala (6).

1.1.3.2. Podjela ekstrakata prema tipu korištenog otapala

Prema tipu korištenog otapala najčešće se ekstrakti dijele na vodene ekstrakte, alkoholne ekstrakte kod kojih su kao ekstrakcijska otapala najčešće korišteni etanol i metanol te uljne ekstrakte kod kojih se kao otapalo najčešće koristi biljno ulje.

1.1.3.3. Podjela ekstrakata prema primjeni

Ekstrakti koji se mogu koristiti odmah nakon pripreve su uglavnom razni infuzati, tinkture, glicerolni ekstrakti i uljni macerati koji predstavljaju konačni ljekoviti oblik (frakciju, izolat) biljke. Obzirom da ovi pripravci u svom sastavu sadrže i otapalo, ono ne smije biti toksično pa se obično pripremaju korištenjem vode, etanola, glicerola te biljne i životinjske masnoće (lipida).

Iz ekstrakata koji se smatraju međuproizvodom se daljnjom obradom dobivaju drugi tipovi ekstrakata, a najčešće suhi ekstrakti. Izbor otapala kod ovih ekstrakata nije ograničen jer se oni podvrgavaju daljnjoj obradi pa se mogu koristiti i toksičnija otapala koja su u malim količinama neškodljiva za ljude, a omogućuju bolji učinak ekstrakcije aktivnih tvari.

Postoje i ekstrakti koji su pogodni za uzimanje odmah nakon pripreve i oni se uglavnom odmah oblikuju u određeni ljekoviti proizvod poput tablete i kapsule. Kod ovakvog tipa ekstrakata najzastupljeniji su suhi preparati, ali njihov pretjeran unos u organizam može imati nepoželjan učinak na ljudsko zdravlje pa se stoga obično odmah formuliraju u proizvode točno određene i poznate mase (4).

1.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali su visokoreaktivne molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Ovi spojevi nastaju kao produkti fotolize ili pirolize, a pokreću i potiču brojne druge procese kao što su oksidacija, fotoliza i polimerizacija (9). Mehanizam djelovanja slobodnih radikala zasniva se na njihovoj težnji ka stabilnosti koju postižu napadanjem i uzimanjem elektrona od najbliže stabilne molekule pri čemu dolazi do njezine pretvorbe u slobodni radikal. Navedeno u konačnici dovodi do lančanih reakcija nastajanja slobodnih radikala i oštećenja brojnih molekula. Znanstveno je dokazano da slobodni radikali sudjeluju u razvoju brojnih bolesti, kao što su: dijabetes, astma, tumori, kardiovaskularne bolesti, bolesti jetre i drugi upalni procesi (10). U organizmu najzastupljenije su reaktivne vrste kisika, poput peroksidnog radikal-aniona ($O^{2-\bullet}$), hidroksilnog radikala ($OH\bullet$), hidroperoksidnog radikala ($HO_2\bullet$) i vodikovog peroksida (H_2O_2). Osim kisikovih vrsta važno je spomenuti i dušikove radikale od kojih su najznačajniji dušikov(II) oksid ($NO\cdot$) i dušikov(IV) oksid ($NO_2\cdot$) te nitrozilni kation (NO^+) i peroksinitrit ($ONOO\cdot$).

Važno je naglasiti kako nisu svi radikali štetni te kako je njihovo nastajanje i djelovanje ponekad i poželjno radi stvaranja energije i poticanja obnove staničnog tkiva. Nemoguće je u potpunosti izbaciti slobodne radikale iz organizma jer su nezaobilazni produkti biokemijski procesa, ali pravilnom prehranom i zdravim životnim navikama moguće je smanjiti njihovu oksidacijsku aktivnost (11).

1.3. Antioksidansi

U antioksidanse se ubrajaju sve tvari čije molekule mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom slobodnom radikal (12), pri čemu u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanasa te sprječavaju pojavu stanja koje se naziva oksidacijski stres. Osim navedenog, antioksidansi sprječavaju nastanak novih radikala te popravljaju oštećenja u stanicama nastala djelovanjem radikala. Antioksidansi se u organizam unose hranom i pićem, a mogu nastati i kao produkti staničnog metabolizma (antioksidacijski enzimi) (11).

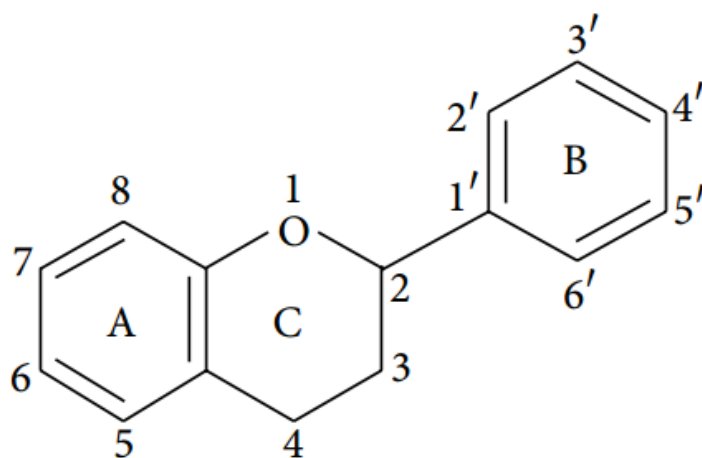
1.4. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su organski spojevi koji u svom sastavu sadrže hidroksilnu skupinu (-OH) vezanu na aromatski prsten. Fenoli su jedna od najzastupljenijih grupa prirodnih spojeva u biljnom carstvu (13), a mogu se kategorizirati u više podgrupa ovisno o biološkoj funkciji ili kemijskoj strukturi. Na osnovu kemijske strukture, fenoli se najjednostavnije dijele na fenolne kiseline, flavonoide, tanine i ostale polifenolne spojeve.

Fenolne kiseline su spojevi koji osim fenolne strukture sadrže i karboksilnu skupinu, a u biljkama se nalaze obično u vezanom ili slobodnom obliku. Smatra se da fenolne kiseline potiču sintezu proteina, sudjeluju u akumulaciji hranjivih tvari i poboljšavaju djelovanje pojedinih enzima (14).

Fenolne kiseline se općenito dijele na derivate benzojeve kiseline i derivate cimetine kiseline (13). Najpoznatije hidroksibenzojeve kiseline su galna, siringinska i vanilinska kiselina, dok su od hidroksicimetnih kiselina najpoznatije ferulinska, *p*-kumarinska i kaveinska kiselina (14).

Flavonoidi imaju opću strukturu koja se sastoji od dva aromatska prstena (prsten A i prsten B) fenolne prirode koji su povezani piranskim prstenom (C) (slika 1). Zbog različitog stupnja oksidacije prstena C, stupnja nezasićenosti te broja i položaja -OH skupina flavonoidi se dijele u podskupine kao što su antocijanini, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni, izoflavoni i flavonoli. Dosadašnja istraživanja su pokazala da od ukupnog broja dosada poznatih fenolnih struktura (oko 8000), više od polovice otpada na flavonoide (13).



Slika 1. Opća struktura flavonoida

Osim fenolnih kiselina i flavonoida, postoji još nekoliko podskupina fenola koji se mogu pronaći u biljkama kao npr. stilbeni (resveratol), lignani, itd.

1.5. Ljekovito bilje

Svjetska zdravstvena organizacija je definirala ljekovitim biljem sve one biljne vrste čiji jedan dio ili više dijelova sadrži biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili za kemijsko farmaceutske sinteze. Istoimena organizacija aromatičnim biljem smatra one vrste koje sadrže jednu ili više aktivnih tvari posebnog mirisa ili okusa te koje se iskorištavaju za spravljanje mirisa, kozmetičkih proizvoda, napitaka i aroma za živežne namirnice (15).

Često izraz ljekovito bilje uključuje i aromatično premda nisu sve aromatične biljne vrste ujedno i ljekovite.

1.5.1. Aktivne tvari biljaka

Aktivne tvari u biljkama dijele se na primarne i sekundarne.

Primarne tvari

U ovu skupinu biljnih sastojaka spadaju tvari koje su biljci neophodne za rast i reprodukciju. Uglavnom su to šećeri i proteini (8).⁸

Šećeri nastaju procesima fotosinteze ili sudjeluju u izgradnji tkiva biljke. Na osnovu molekulske težine dijele se na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Najznačajniji jednostavni šećeri su glukoza, fruktoza, manitol i sorbitol (šećerni alkoholi), ksilitol, inozitol, oligosaharidni šećeri u malim količinama (laktoza, saharoza i maltoza) te polisaharidi kao što su škrob, celuloza, pektini, biljne gume i sluzi (16).¹⁶

Sekundarne tvari

Sekundarne tvari su tvari koje ne sudjeluju izravno u razvoju biljke, iako neki smatraju da su podjednako važne kao primarne tvari. Obično ih se naziva biološki aktivnim tvarima (8).

U ovu skupinu spojeva ubrajaju se lipidi (masti i ulja uključujući i eterična ulja), lipoidi (voskovi, fosfolipidi, steroidi, masni alkoholi, karotenoidi i vitamini topivi u mastima), glikozidi (saponini, kumarini, antrakinoni, hidrokinoni), gorke tvari (amara), ljute tvari (acria), trijesovine, alkaloidi, vitamini, itd (16).

1.6. Skupljanje, sušenje i čuvanje ljekovitog bilja

Skupljači ljekovitog bilja moraju raspoznavati biljne vrste, koristiti pravilnu tehniku branja, sušenja i skladištenja te također moraju biti upućeni u zakone koji se primjenjuju u sektoru ljekovitog bilja (17).

Pravila kojih se potrebno pridržavati kako bi skupljanje bilja bilo uspješno:

1. Cijela biljka ili samo dio skuplja se u periodu kada u sebi sadrži najveću količinu aktivnih tvari tj. ljekovitih tvari i hlapljivih komponenti poput eteričnog ulja.
2. Bilje se bere po lijepom i suhom vremenu, obično u prijedopodnevnim satima nakon jutarnje rose, razlog tome je što vlažne biljke bilo od rose ili kiše gube na kvaliteti i brzo se kvare.

Svaki dio biljke ima svoj način branja. Cvjetovi se beru isključivo ručno i najčešće kroz jutro kad su potpuno otvoreni. Listovi se beru zajedno sa stabljikom koja se reže u cijelosti nekoliko cm iznad tla, a kasnije se ručno otklanjaju sa stabljike. Korijenje i podanci se vade zajedno sa cijelom biljkom, pa se naknadno odstranjuje višak biljke, kamenje i zemlja. Stabljika se bere tako da se odreže nekoliko cm iznad tla pazeći da se pri tome ne ošteti korijen (17,18).

3. Područje u kojem se biljke skupljaju ne smije biti zagađeno i u blizini velikih prometnica i industrija (18).
4. Potrebno je napraviti procjenu veličine populacije na terenu kako ne bi došlo do iscrpljivanja resursa na području skupljanja.
5. Potrebno je poznavati vrste čije je skupljanje zabranjeno ili ograničeno (17).

Nakon branja, biljke ili dijelovi biljaka podvrgavaju se sušenju pri čemu biljka ili dijelovi biljke gube vodu, a zadržavaju ljekovite tvari. Manje količine ljekovitog bilja mogu se sušiti prirodno u zatvorenom, ali prozračnom prostoru, dok se veće količine suše u za to prikladnim sušionama. Osušeni pripravci se pakiraju u prozračne papirnate vrećice i čuvaju se na prozračnim mjestima (18).

1.7. Lavanda (*Lavandula officinalis*)

Sistematika

Carstvo: Plantae

Divizija: Magnoliophita

Razred: Magnoliopsida

Red: Lamiales

Porodica: Lamiaceae

Rod: *Lavandula*

Vrsta: *Lavandula officinalis*



Slika 2. *Lavandula officinalis*-lavanda (19)

Lavanda je mali aromatični grm, podrijetlom iz Sredozemlja, koji se kroz povijest koristio kao ugodan dodatak jelima i mirisnim kupkama. Naziv ove biljke potječe od latinske riječi *lavare* što u prijevodu znači pranje (16,20). Dosadašnja primjena lavande bila je uglavnom u kućanstvu i u kozmetičkoj industriji, no suvremena istraživanja su pokazala da lavanda posjeduje ogromni potencijal po pitanju ljekovitosti pa se u novije vrijeme još naziva „švicarski nož herbalne medicine“ (21).

1.7.1. Opis biljke

Lavanda pripada porodici Lamiaceae (usnače). Karakteristike biljaka koje pripadaju ovoj porodici su četverobridna stabljika, grmoliki i polugrmoliki rast, nasuprotni položaj listova, cvjetovi su većinom skupljeni u prividne pršljenove, plod je kalavac. Sve biljke ove porodice sadrže eterična ulja u svim dijelovima biljke, a njih izlučuju žljezdane dlačice ili karakteristične ljuskaste žlijezde. Eterična ulja lavande se dobivaju destilacijom cvijeta (8). Drugi nazivi za lavandu su: uskolisni despić, pravi despić, uskolisna lavanda, lavanda obična, itd (20).

Lavanda pripada rodu *Lavandula* koji broji 48 vrsta koje uspijevaju na nadmorskim visinama od 500 do 1700 m. Lavanda je višegodišnja biljka koja raste u obliku poluloptastog grma na dobro osunčanim mjestima. Razlikujemo pravu lavandu od hibridnih vrsta. Visina grma prave lavande je 40-60 cm, a promjer 80-120 cm. Cvjetne grane lavande su duge 20-40 cm i na sebi nose nasuprotne, uske listove cjelovitog ruba, duge 3-5 cm, široke 0,2-0,5 cm, sivo-zelenkaste boje(8). Općenito vrste lavanda se dijele u 6 razreda, a njih četiri su važna kao ljekovite biljke. Za sve vrste lavande karakterističan je jak, prepoznatljiv miris koji potječe od nakupljenog eteričnog ulja.

1.7.2. Stanište i rasprostranjenost

Lavanda nema velike zahtjeve po pitanju kvalitete tla. Biljci odgovara blaga klima s puno sunca i malo padalina. Rasprostranjena je na gotovo svim kontinentima, a smatra se da potječe sa Sredozemlja. Lavanda može bit uzgojena ili samonikla. Uzgoj lavande je dosta ekonomičan jer lavanda dobro podnosi sušu osim u početnoj fazi rasta, može preživjeti i niske temperature u fazi mirovanja, ali tijekom vegetacije zahtjeva visoke temperature. Preporuča se i mineralna gnojidba radi boljih prinosa (8). Najveći proizvođači lavande u Europi su Francuska, Italija, Bugarska, Mađarska i Engleska, a na drugim kontinentima SAD, Alžir, Argentina i Tasmanija (8). Ostale države i područja u kojima se proizvodi lavanda, ali u manjim količinama su Hrvatska, Albanija, Španjolska, Srbija, Crna Gora i Australija (22).

Prema povijesnim podacima lavanda se u Dalmaciji počela uzgajati poslije Prvoga svjetskog rata. Postojale su kulture prave lavande, ali i križanaca na otocima Hvaru, Braču i Visu. Najviše lavande se u Republici Hrvatskoj uzgaja na Jadranu. Glavno područje uzgoja je otok Hvar, odnosno sela Velo Grablje i Brusje, a može se pronaći i u Petrovom polju, na Paklenskim otocima, Visu, Korčuli, Lastovu i Braču, u Splitu, Zadru, na Pagu, Rabu, Krku, sve do Vodnjana, Jadreškog i dr (23). Lavanda se uzgaja i na području Kontinentalne Hrvatske; prinosi su znatno manji, ali nisu beznačajni. Pretpostavlja se da je prva značajnija količina lavande, preciznije budrovke posađena 2007. godine u okolici Slavonskog Broda, a danas se može pronaći na području cijele Kontinentalne Hrvatske (23).

1.7.3. Kemijski sastav lavande i eteričnog ulja lavande

Svježi cvijet lavande sadrži 1-3% eteričnog ulja, približno 12% ružmarinske kiseline i drugih njenih derivata, zatim kumarina: umbelferona i herniarina, flavonoida i fitosterola (22). Sušenjem cvjetova povećava se udio eteričnog ulja u njima. Količinski najzastupljeniji sastojci eteričnog ulja su linalil acetat (35-60%) i linalol (do 40%). Ostali sastojci su 1,8-cineol, borneol, kamfor, geranid, citronelal i neki terpeniski ugljikovodici. Kvaliteta i količina eteričnog ulja ovise o zastupljenosti pojedinih komponenta u sastavu i agrotehničkim uvjetima. Kvalitetnija ulja sadrže veću količinu linalil acetata.

Udio linalil acetata je karakterističan za vrste pa tako hibridna lavanda ima znatno manji udio linalil acetata (7-16%) u odnosu na pravu lavandu. Kišno i hladno vrijeme tijekom cvjetanja smanjuju udio eteričnog ulja za 50% kao i udio estera u njemu (do 30%) (8).

1.7.4. Djelovanje i upotreba lavande

Opće je poznato da lavanda ima sedativan i umirujući učinak na organizam. Novija istraživanja su pokazala da miris lavande smanjuje stres te naznačila da postoji mogućnost njezine upotrebe u liječenju depresivnih stanja, tjeskobe i glavobolja izazvanih napetošću. Lavanda ima antiseptičko i antibakterijsko djelovanje pa se često njezini pripravci koriste za smirivanje kožnih infekcija (20). Lavanda i njeni pripravci imaju široku primjenu u kućanstvu, narodnoj medicini, pojedinim industrijama, a sve su zanimljiviji i u agronomskom pogledu. Svježa lavanda se može dodati u džemove, sladolede, ocat i biljne čajeve. Čaj s cvijetom lavande se preporuča kod liječenja poremećaja kao što su nemir i nesanica, problema s cirkulacijom, crijevnih tegoba, nadutosti i nelagode (22). Sušena lavanda se obično koristi kao začim i kao punjenje za mirisne vrećice protiv moljaca. Eterično ulje lavande potiče epitelizaciju i brže zacjeljivanje rana (23). Može se direktno nanositi na kožu, dodavati u čajeve, mirisne kupke ili sapune. Upotrebljava se i u veterini jer nanoseno na dlaku vrata životinje odbija razne insekte (16). Eterično ulje lavande se najviše koristi u aromaterapiji jer potiče smanjenje stresa i stimulira osjetila. Od ostalih pripravaka lavande koji se koriste bitno je spomenuti i hidrolate koji nastaju kao nusprodukt destilacije biljnog materijala pri proizvodnji eteričnih ulja, a koji se koriste za njegu i hidrataciju osjetljive kože, kod problema s aknama ili kao tonik poslije brijanja (23).

2. Eksperimentalni dio

2.1. Kemikalije i uređaji

Svi reagensi i otapala korišteni u ovom istraživanju bili su potrebne analitičke čistoće, a njihovi proizvođači su Kemika (Zagreb, Hrvatska), Merck (Darmstadt, Njemačka) i Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka).

Spektrofotometrijska mjerenja rađena su korištenjem UV-Vis double beam spektrometra Specord 200 (Analytik Jena GmbH, Njemačka).

2.2. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada korišten je biljni materijal koji je ubran na ekološki čistom području Parka prirode Biokovo u lipnju 2017. godine. Biljni materijal je nakon branja sušen na tamnom i prozračnom mjestu tijekom 3 tjedna. Za istraživanje je korišten nadzemni dio biljke (stabljika, list i cvijet) kojem je prije postupka homogenizacije do finog praha u mlincu uklonjen drvenasti dio.

2.3. Priprema ekstrakata

Ekstrakti su pripremljeni tako da je odvagano 5 g homogeniziranog suhog biljnog materijala kojem je potom dodano 5 mL otapala. U ovom radu korištena su dva otapala; voda i 80%-tni etanol, a ekstrakcija se izvodila u ultrazvučnoj kupelji u različitom trajanju (tijekom 30, 60 i 90 minuta). Testirana je također i učinkovitost ekstrakcije pri različitim temperaturama (sobnoj temperaturi i pri 60 °C), utjecaj miješanja kao i maceracija u trajanju od 72 h.

Opis primijenjenih postupaka ekstrakcije:

- A, B, C- Ultrazvučna ekstrakcija na sobnoj temperaturi u trajanju od 30, 60 i 90 min.
Kao ekstrakcijsko otapalo se koristila voda.
- D, E, F- Ultrazvučna ekstrakcija na sobnoj temperaturi u trajanju od 30, 60 i 90 min.
Kao ekstrakcijsko otapalo se koristio 80%-tni etanol.
- G, H, I- Ultrazvučna ekstrakcija na temperaturi od 60 °C u trajanju od 30, 60 i 90 min.
Kao ekstrakcijsko otapalo se koristila voda.

- J, K, L- Ultrazvučna ekstrakcija na temperaturi od 60 °C u trajanju od 30, 60 i 90 min. Kao ekstrakcijsko otapalo se koristio 80%-tni etanol.
- M- Ekstrakcija otapalom uz miješanje na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Kao ekstrakcijsko otapalo se koristila voda.
- N- Ekstrakcija otapalom uz miješanje na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Kao ekstrakcijsko otapalo se koristio 80%-tni etanol.
- O- Ekstrakcija postupkom maceracije u trajanju od 72 h na sobnoj temperaturi kojoj je prethodilo miješanje u trajanju od 30 min. Kao ekstrakcijsko otapalo se koristila voda.
- P- Ekstrakcija postupkom maceracije u trajanju od 72 h na sobnoj temperaturi kojoj je prethodilo miješanje u trajanju od 30 min. Kao ekstrakcijsko otapalo se koristio 80%-tni etanol.

2.4. Metoda određivanja ukupnih fenola

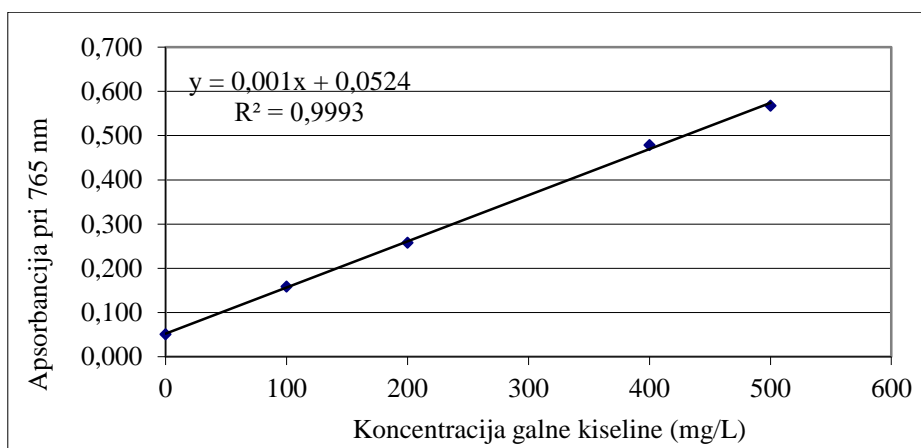
Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodilo se primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu nastaje plavo obojenje čiji se intenzitet mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (23). Ova metoda se temelji na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom FC reagensa u lužnatim uvjetima (pH=10) koji se postižu dodatkom otopine natrijeva karbonata. Intenzitet nastalog plavog obojenja je proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva (25).

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens
2. Otopina natrij karbonata (20%-tna)
3. Matična otopina standarda galne kiseline (koncentracije 100-500 mg/L)

Postupak:

U kivetu se odpipetira 25 μ L uzorka (etanolni ili vodeni ekstrakt), 1,975 mL destilirane vode i 125 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se promiješa i nakon par minuta joj se doda 375 μ L otopine natrijevog karbonata. Ovako pripremljeni uzorci se ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega im se očita vrijednosti apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj dužini od 765 nm. Kao referentni standard koristila se galna kiselina (baždarni pravac prikazan na slici 3) pa su se stoga dobiveni rezultati izrazili u ekvivalentima galne kiseline (GAE) (25).



Slika 3. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenola. Kao standard korištene su otopine različitih koncentracija galne kiseline

2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metodom

Ova metoda temelji se na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju ($\text{pH} = 3,6$) reduciraju žuti kompleks Fe^{3+} sa 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ, pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intenzitet nastalog obojenja pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (26).

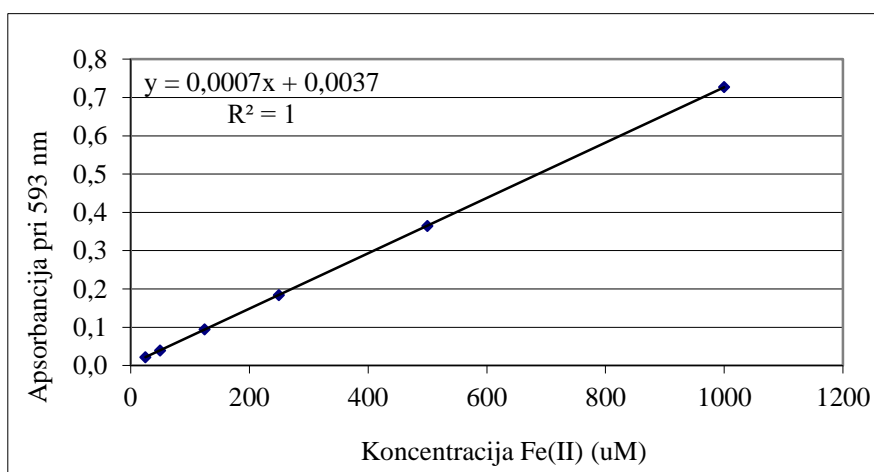
Reagensi:

1. Acetatni pufer ($c=300$ mmol/L)
2. Otopina TPTZ-a u 40 mmol/L HCl ($c=10$ mmol/L)
3. Otopina željezo(III) klorida ($c=20$ mmol/L)
4. Matična otopina standarda iona Fe^{2+}

Priprema radnog FRAP reagensa (svaki dan svježa otopina): 50 mL acetatnog pufera, 5 mL otopine TPTZ i 5 mL otopine Fe^{3+} .

Postupak:

U 3 mL svježe pripremljenog FRAP reagensa kojem se izmjerila vrijednost apsorbancije pri 593 nm (A_0) se doda 100 μ L uzorka. ApSORBANCija smjese se izmjeri nakon točno 4 minute (A_4), a razlika konačne i početne vrijednosti se ubaci u jednadžbu baždarnog pravca koji je konstruiran testiranjem otopina Fe^{2+} različitih koncentracija (25-1000 $\mu\text{mol/L}$) te se preko nje izračuna redukcijska snaga odnosno FRAP vrijednost uzorka. Dobiveni rezultati su stoga izraženi u ekvivalentima Fe^{2+} .



Slika 4. Baždarni pravac za FRAP metodu. Kao standard korištene su otopine Fe^{2+} različitih koncentracija

2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH je tzv. metoda *gašenja* slobodnih radikala koja se temelji na mehanizmu prijenosa elektrona. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH^{\bullet}) posjeduje jedan nespareni valentni elektron na jednom atomu dušikova mosta. Ovaj radikal je jedan od nekolicine organskih dušikovih radikala koji su vremenski postojani i komercijalno dostupni. Otopina ovog spoja je intenzivno (ljubičasto) obojena, a u reakciji s antioksidansima blijedi. Sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH radikal prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 517 nm (27).

Reagensi:

1. Otopina DPPH radikala (apsorbancija oko 1,2)

Postupak:

U kivetu u kojoj se nalazi 2 mL svježe pripremljene otopine DPPH reagensa kojem je izmjerena apsorbancija se doda 50 μ L uzorka. Nakon sat vremena uzorcima se opet izmjeri apsorbancija te se iz dobivenih rezultata odredi (izračuna) postotak inhibicije DPPH radikala, ili odnosno antioksidacijska aktivnost uzoraka prema izrazu (27):

$$\% \text{ inhibicije DPPH}^{\bullet} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

gdje je:

$A_{C(0)}$ – apsorbancija kontrole (otopina DPPH[•])

$A_{A(t)}$ – apsorbancija reakcijske smjese nakon 1h

3.Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada je bio istražiti kako odabir otapala i čimbenici ekstrakcije, trajanje procesa ekstrakcije i temperatura pri kojoj se ekstrakcija provodi, utječu na sadržaj ukupnih fenola i na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lavande. U tu svrhu pripremljeno je ukupno 16 ekstrakata, 8 alkoholnih i 8 vodenih uzoraka, a njih 10 je podvrgnuto djelovanju ultrazvuka u različitom trajanju dok su dva podvrgnuta procesu maceracije kojem je prethodilo miješanje u trajanju od 30 minuta. Postupci ultrazvučne ekstrakcije izvođeni su na sobnoj temperaturi i pri temperaturi od 60 °C.

Svi rezultati dobiveni u ovom istraživanju prikazani su u tablici 2, dok su u daljnjem tekstu zbog lakše usporedbe i diskusije prikazani u grupama obzirom na parametar koji se određivao (fenolni sastav i antioksidacijska aktivnost) te temperaturu pri kojoj se ekstrakcija izvodila.

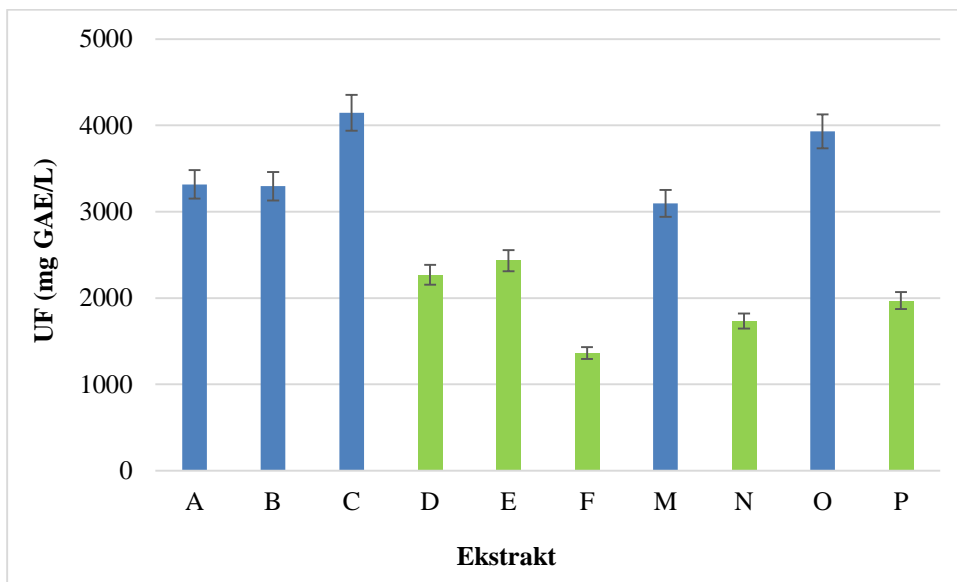
Tablica 1. Pregledni prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola, te antioksidacijske aktivnosti ekstrakata metodama FRAP i DPPH

| Uz ora k | Čimbenici ekstrakcije | Ukupni fenoli (mg GAE/L) | FRAP ($\mu\text{M Fe}^{2+}$) | Inibicija DPPH (%) |
|----------------|--|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| A | 30 min, RT, voda, UZ, | 3316 \pm 75 | 17647 \pm 286 | 37 \pm 4 |
| B | 60 min, RT, voda, UZ, | 3296 \pm 27 | 23980 \pm 368 | 68 \pm 2 |
| C | 90 min, RT, voda, UZ | 4146 \pm 30 | 37000 \pm 610 | 90 \pm 0 |
| D | 30 min, RT, etanol, UZ | 2269 \pm 23 | 27957 \pm 394 | 89 \pm 1 |
| E | 60 min, RT, etanol, UZ | 2433 \pm 21 | 30071 \pm 237 | 91 \pm 0 |
| F | 90 min, RT, etanol, UZ | 1363 \pm 79 | 16642 \pm 666 | 64 \pm 13 |
| G | 30 min, 60°C, voda, UZ | 4763 \pm 144 | 39404 \pm 213 | 89 \pm 0 |
| H | 60 min, 60°C, voda, UZ | 3636 \pm 10 | 37628 \pm 485 | 90 \pm 0 |
| I | 90 min, 60°C, voda, UZ | 4873 \pm 80 | 42780 \pm 379 | 90 \pm 0 |
| J | 30 min, 60°C, etanol, UZ | 1616 \pm 10 | 22747 \pm 43 | 71 \pm 17 |
| K | 60 min, 60°C, etanol, UZ | 1642 \pm 79 | 20461 \pm 274 | 86 \pm 11 |
| L | 90 min, 60°C, etanol, UZ | 1809 \pm 12 | 28419 \pm 578 | 92 \pm 1 |
| M | 30 min, RT, voda, miješanje | 3096 \pm 62 | 15028 \pm 79 | 45 \pm 3 |
| N | 30 min, RT, etanol, miješanje | 1733 \pm 25 | 22528 \pm 293 | 90 \pm 1 |
| O | 30 min, RT, voda, miješanje, stajanje 72 h | 3929 \pm 93 | 45119 \pm 62 | 59 \pm 4 |
| P | 30 min, RT, etanol, miješanje, stajanje 72 h | 1969 \pm 15 | 45323 \pm 95 | 80 \pm 3 |

RT- sobna temperatura, UZ- ultrazvuk, GAE- ekvivalenti galne kiseline

3.1. Rezultati određivanja sadržaja fenola

Ukupni fenoli u alkoholnim i vodenim ekstraktima određeni su Folin-Ciocalteu metodom, a dobiveni rezultati su grafički prikazani na slici 5 i slici 6.



*plavo – vodeni ekstrakti, zeleno- etanolni ekstrakti

Slika 5. Grafički prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima lavande pripremljenih pri sobnoj temperaturi

Prema usporednom prikazu dobivenih rezultata u pripremljenim uzorcima, jasno je vidljivo da postoje razlike u fenolnom sastavu između ekstrakata. Udio izoliranih fenolnih spojeva je veći u vodenim ekstraktima (3096 – 4146 mg GAE/L) nego li u etanolnim (1363 – 2433 mg GAE/L). Obzirom da je voda polarnije otapalo od etanola na temelju ovog može se zaključiti da je i pogodnije otapalo za ekstrakciju biološki aktivnih fenola iz lavande.

Najveći udio fenola je pronađen u vodenom ekstraktu C koji je pripremljen pri sobnoj temperaturi u trajanju od 90 min uz djelovanje ultrazvuka. Najniži udio fenola je imao ekstrakt F koji je pripremljen na isti način samo je kao otapalo kod njega korišten etanol. Izrazito visok sadržaj fenola dokazan je u ekstraktu O (3929 mg GAE/L) koji je pripremljen postupkom maceracije tijekom 72 h.

Ukoliko se promatraju vodeni ekstrakti pripremljeni djelovanjem ultrazvuka vidljivo je da se s produljivanjem vremena tretiranja ultrazvukom, udio fenolnih komponenti u ekstraktima povećava (uzorci A, B i C).

To je naravno i očekivano obzirom da je produljeni kontakt tj. vrijeme ekstrakcije proporcionalno njenoj djelotvornosti. Ipak, rezultati dobiveni za etanolne ekstrakte ne potvrđuju zaključke koji se mogu donijeti za vodene ekstrakte. Kod ovih ekstrakata najveći udio fenola je dobiven ekstrakcijom u trajanju tijekom 60 minuta dok produljeno vrijeme ekstrakcije (90 min) dovodi do opadanja koncentracije fenola čemu je vjerojatno uzrok polimerizacija i taloženje ovih spojeva.

Također, uzorak M je pripremljen postupkom miješanja tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi dok je uzorak O pripremljen istim postupkom, ali je nakon toga ostavljen 72 h da stoji. Vidljivo je stoga da je maceracija izazvala dodatnu ekstrakciju fenola iz biljnog materijala što je uzrokovalo porast koncentracije fenola sa 3096 na 3929 mg GAE/L. Isti zaključak se može donijeti gledajući etanolne ekstrakte N i P gdje je zabilježen porast sa 1733 na 1969 mg GAE/L.

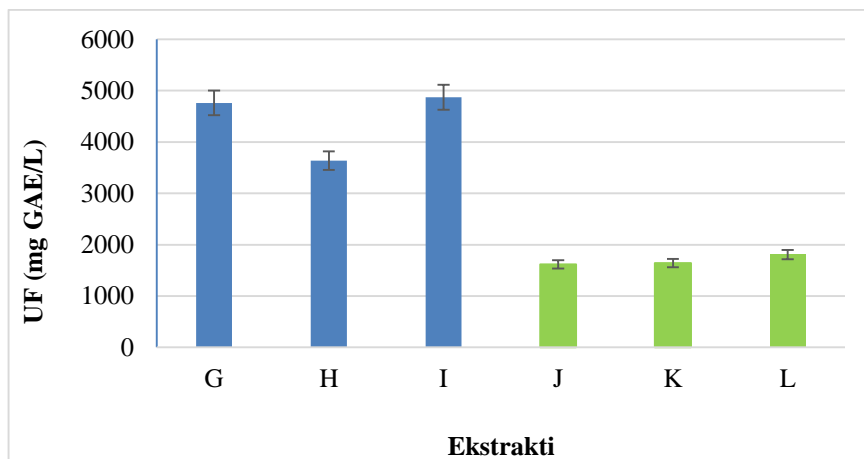
Kako bi se ispitalo kakav utjecaj može imati temperatura na uspješnost ultrazvučne ekstrakcije, šest uzoraka (tri vodena i tri alkoholna) je ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji zagrijanoj na 60 °C, a dobiveni rezultati su uspoređeni s onima dobivenim istom metodom ekstrakcije pri sobnoj temperaturi.

Dobiveni rezultati kod vodenih ekstrakata ukazuju da povećana temperatura tijekom procesa ekstrakcije s ultrazvukom pospješuje izolaciju fenola iz biljnog materijala. Ipak kod uzorka H je očekivana nešto veća vrijednost nego li je detektirana (3636 mg GAE/L).

S etanolnim ekstraktima je situacija bila drugačija, te su kod dva od tri uzorka zabilježene niže vrijednosti UF, dok je uzorak ekstrahirano primjenom ultrazvuka tijekom 90 minuta ipak pokazao iscrpniju ekstrakciju.

Kod uzoraka pripremljenih ekstrakcijom pri 60 °C najveći udio fenola u vodenim ekstraktima ima ekstrakt pripremljen korištenjem ultrazvuka tijekom 90 minuta, dok je kod uzorka pripremljenog tijekom 60 minuta uočena znatno niža vrijednost.

Etanolni ekstrakti su pak pokazali pravilno povećanje udjela fenola s vremenom izloženosti ultrazvuku.



*plavo – vodeni ekstrakti, zeleno- etanolni ekstrakti

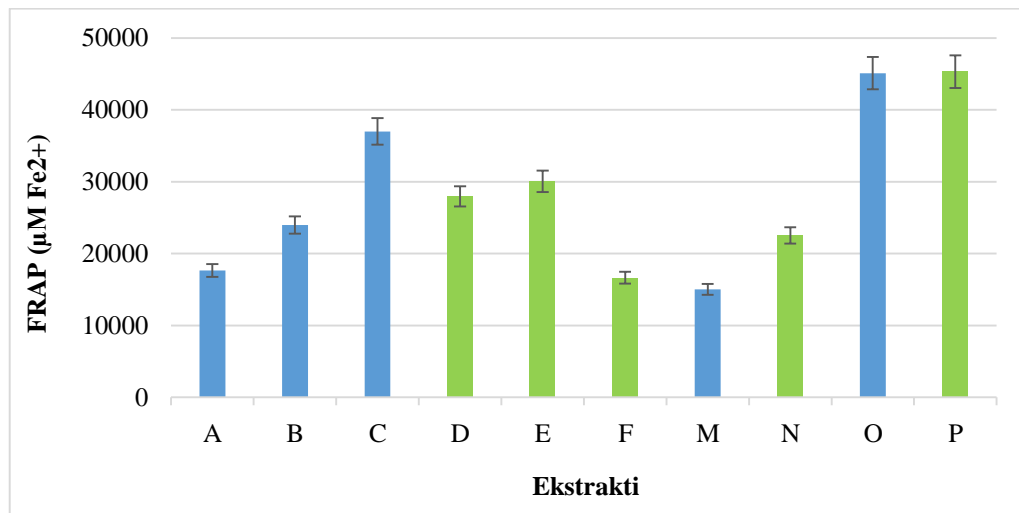
Slika 6. Grafički prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima lavande pripravljenih pri temperaturi od 60°C

3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata određena je dvjema metodama, metodom FRAP i metodom DPPH.

3.2.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom su prikazani grafički na slikama 7 i 8.



*plavo – vodeni ekstrakti, zeleno- etanolni ekstrakti

Slika 7. Grafički prikaz rezultata određivanja FRAP vrijednosti ekstrakata lavande pripremljenih pri sobnoj temperaturi

Na slici 7 su prikazani rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata pripremljenim na sobnoj temperaturi procesima ultrazvučne ekstrakcije i maceracije te je sa slike vidljivo da je najveći antioksidacijski potencijal zabilježen kod ekstrakta P, a najmanji kod ekstrakta M.

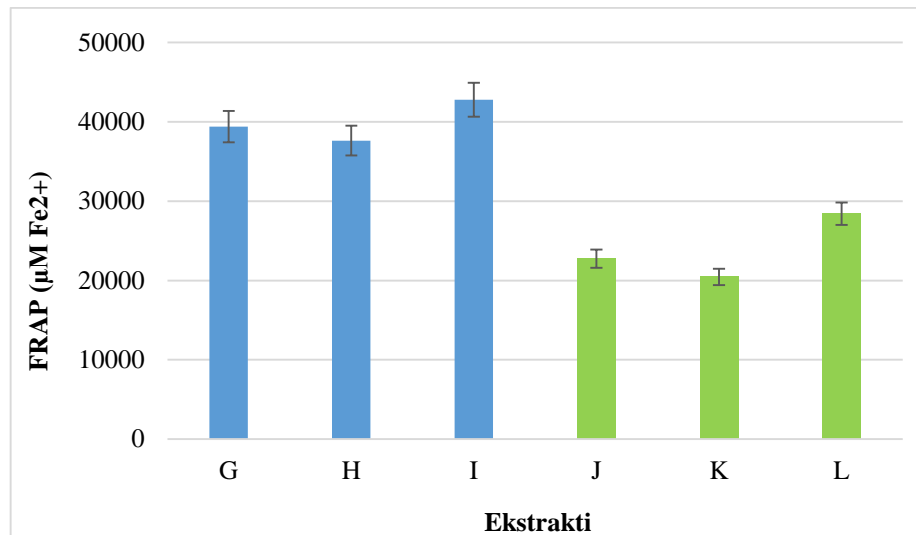
Uspoređujući rezultate FRAP-a s vrijednostima sadržaja ukupnih fenola uočava se slaganje u rezultatima. Kod vodenih ekstrakata tretiranim ultrazvukom pri temperaturi 60 °C je situacija identična.

Naime, u uzorcima gdje je zabilježena najmanja količina fenola, a to je u uzorku H, FRAP metodom je izmjerena i najniža antioksidacijska aktivnost (slika 8).

Kod etanolnih ekstrakata su rezultati FRAP vrijednosti također usko povezani s količinom ukupnih fenola. Očekivano, najveći antioksidacijski potencijal izmjeren je u ekstraktu E obzirom da je u istom određena i najveća količina fenola. Općenito, etanolni ekstrakti su pokazali slabiju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na vodene ekstrakte. Najmanja FRAP vrijednost je zabilježena za ekstrakt F (slika 7).

Dobiveni rezultati mjerenja antioksidacijskog potencijala u ekstraktima dobivenim postupkom maceracije također dovode do jednakih zaključaka koji su dobiveni za određivanje fenola, a to je da produljen kontakt biljnog materijala i otapala (72 h maceracije nakon miješanja u trajanju od 30 minuta) rezultira boljom aktivnošću ekstrakata.

Najveća redukcijska aktivnost je određena za uzorak P i iznosi 45323 $\mu\text{M Fe}^{2+}$. Na slici 7 se jasno vidi da etanolni ekstrakti (N i P) imaju veći antioksidacijski potencijal u odnosu na vodene ekstrakte iako je u istima dokazana znatno niža količina fenola u odnosu na vodene ekstrakte. Razlog tome može biti antioksidacijsko djelovanje tj. redukcijska aktivnost fenola topljivijih u alkoholu ili nekih drugih bioaktivnih komponenti koje se prisutne u ekstraktima, a čija je topljivost puno bolja u etanolu nego li u vodi.



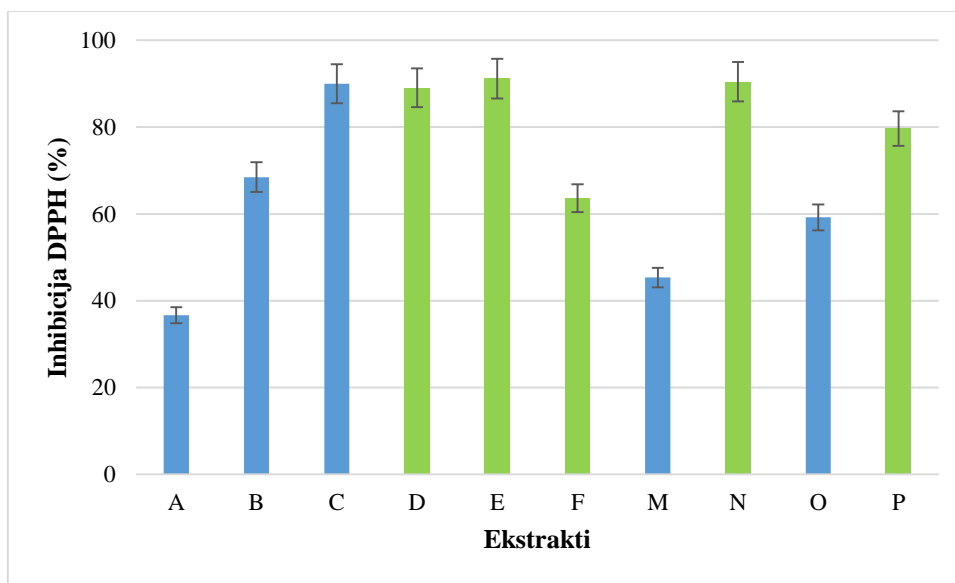
*plavo – vodeni ekstrakti, zeleno- etanolni ekstrakti

Slika 8. Grafički prikaz rezultata određivanja FRAP vrijednosti ekstrakata lavande pripremljenih pri 60 °C

Na slici 8 su prikazani rezultati dobiveni FRAP metodom za ekstrakte pripremljene pri 60 °C. Najnižu antioksidacijsku aktivnost pokazao je ekstrakt K, a najvišu ekstrakt I. Iako je u ekstraktu K dokazan viši sadržaj fenola nego li ekstraktu J, njegova redukcijska aktivnost je bila slabija.

3.2.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na slikama 9 i 10 vidljiva je razlika u antiradikalском učinku među ekstraktima. Ono što se može primijetiti kod rezultata dobivenih DPPH metodom je gotovo u potpunosti slaganje istih sa sadržajem fenola u njima.



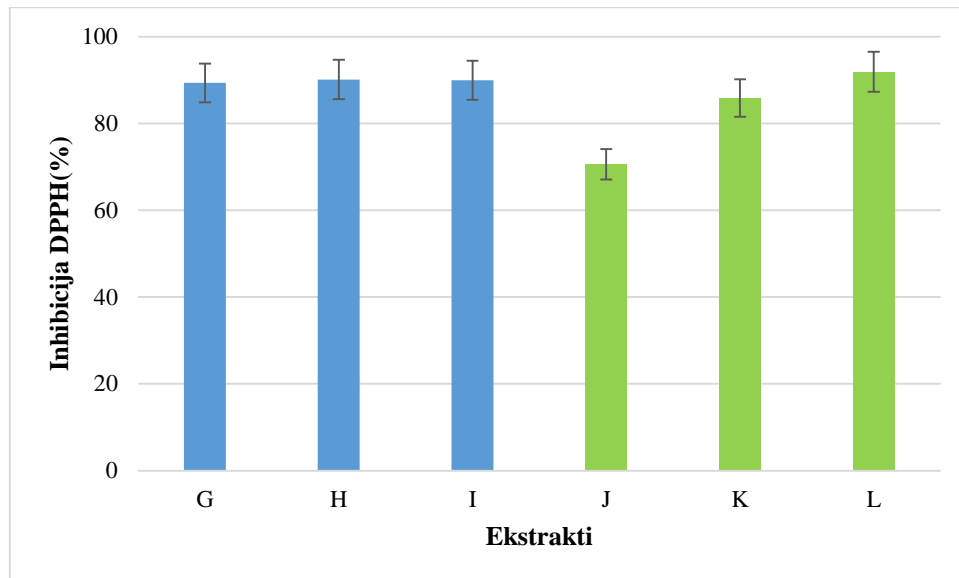
*plavo – vodeni ekstrakti, zeleno- etanolni ekstrakti

Slika 9. Grafički prikaz rezultata određivanja inhibicije DPPH radikala za ekstrakte lavande pripravljene pri sobnoj temperaturi

Najveći postotak inhibicije DPPH radikala je zabilježen u etanolnom ekstraktu tretiranom ultrazvukom u trajanju od 90 min pri temperaturi od 60 °C (ekstrakt L) i iznosi gotovo 92%. U uzorcima A, B, C postotak inhibicije DPPH radikala raste proporcionalno s trajanjem tretmana ultrazvukom pa je najniža vrijednost zabilježena u uzorku A.

Ekstrakcijski postupci kod kojih je slijedila maceracija u trajanju od 72 h su rezultirali boljom aktivnošću. Jedino što se može primijetiti kako je aktivnost alkoholnih ekstrakata kod ovih postupaka veća nego li vodenih iako je sadržaj fenola u njima bio veći.

Na slici 10 prikazani su rezultati određivanja inhibicije DPPH radikala za ekstrakte lavande pripravljene pri 60 °C



*plavo – vodeni ekstrakti, zeleno- etanolni ekstrakti

Slika 10. Grafički prikaz rezultata određivanja inhibicije DPPH radikala za ekstrakte lavande pripravljene pri 60 °C

U vodenim ekstraktima tretiranim ultrazvukom u trajanju od 30, 60, 90 minuta vrijednost postotka DPPH radikala se bitno ne razlikuje i kreće se u rasponu od 89-92% (slika 10). Kod alkoholnih ekstrakata su zabilježene ipak male razlike koje ukazuju na to da ekstrakti pripremljeni duljim tretmanom ultrazvukom daju uzorke koji su pokazali bolju aktivnost prema DPPH radikalima odnosno inhibiciji istih.

4. Zaključak

- Rezultati ukazuju na važnost testiranja različitih čimbenika ekstrakcije u svrhu određivanja onih najpovoljnijih za izolaciju fenolnih spojeva iz lavande.
- Parametri poput temperature, vrijeme trajanja ekstrakcije i odabir otapala uvelike imaju utjecaj na udio fenola i antioksidacijsku djelotvornost ekstrakata.
- Dulji tretman ultrazvukom i povišena temperatura tijekom ekstrakcije poboljšavaju izolaciju fenolnih komponenti u etanolnim ekstraktima, dok viša temperatura pospješuje izolaciju fenola iz biljnog materijala kod ekstrakata u kojima je korištena voda kao ekstrakcijsko otapalo.
- Trajanje maceracije također utječe na izolaciju fenola iz biljnog materijala i antioksidacijsku djelotvornost ekstrakata.
- Etanolni ekstrakti su pokazali znatno bolju redukcijsku aktivnost u odnosu na vodene ekstrakte, dok su razlike u rezultatima dobivenim DPPH metodom bile znatno manje te se kod ove metode antiradikalna učinkovitost povećavala paralelno s produljenjem trajanja tretmana ultrazvukom pri 60 °C.

5. Literatura

1. Lovrić T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva* Zagreb, HINUS Miramarska 13b, 299-300.
2. URL:<https://glossary.periodni.com> (Pristupljeno:04.09.2018)
3. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plant* Trieste, Italy, ICS-UNIDO, 2008.
4. URL:<http://www.plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/> (Pristupljeno: 07.09.2018.)
5. Drmić H, Režek Jambrak, A. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds. *Croat J Food Sci Technol* 2010;2(2):22-33.
6. Savić Lj. Metode ekstrakcije biljnih materijala: Usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen dioksida. *Lek sir.* 2014;34(34):93-103
7. URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/14356007.b03_06.pub2 (Pristupljeno: 07.09.2018)
8. Grozdanić Đ, Šilješ I, Grgesina I. *Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja* Zagreb, Školska knjiga, 1992.
9. URL: <https://glossary.periodni.com> (Pristupljeno:14.09.2018)
10. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida *Arh Hig Rada Toksikol.* 2004;4(55):279-290.
11. Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Kopačin T, Jozinović A, Jović T, et al. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo*, 2016;70,(2):71-92.
12. Marković M, Talić S. Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovačkih vina. *Kem Ind.* 2013;62(1-2):7-12
13. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/> (Pristupljeno:08.09.2018)
14. URL:<https://agroekonomija.wordpress.com/2011/01/18/fenolne-kiseline/> (Pristupljeno:08.09.2018)
15. URL:
http://vladimirkreca.com/vvkk/zdravlje/LJEKOVITO_BILJE_Brosura_BIOPA (Pristupljeno:15.09.2018).
16. Galle Toplak K. *Domaće ljekovito bilje*, Zagreb: Mozaik knjiga, 2016.
17. Dajić Stevanović Z, Stešević D, Pljevljakušić D. *Regionalni priručnik za sakupljače ljekovitog bilja Opština Plužine(Crna Gora), Opština Ljubovija (Srbija)*, 2013.

18. URL: <https://www.ljekovito-bilje.com.hr/images/pdf/upute%20i%20pravila.pdf>
(Pristupljeno:15.09.2018)
19. https://scs.wikipedia.org/wiki/Levandule_1%C3%A9ka%C5%99sk%C3%A1#mediaFile:Lavandula_angustifolia_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-087.jpg
20. Crnetić T, Crnetić B. (ur.) Prirodni lijekovi: Vodič kroz ljekovito bilje i njegovu primjenu, Zagreb, Mozaik knjiga, 2006.
21. Borovac I. (ur.) Sve o ljekovitim i začinskim biljkama, Zagreb, Mozaik knjiga, 2009.
22. Greblo K. Antioksidativno i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja i ekstrakata lavande, Završni rad, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2009.
23. Grbeša A. Morfološka obilježja i ljekovita svojstva lavande, te mogućnosti njezina uzgoja. Završni rad, Osijek, Poljoprivredni fakultet, 2006.
24. Bečić I, Polović I. Utjecaj područja uzgoja i termina berbe na koncentraciju antocijana, elaginske kiseline i derivata te antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost sjemenki nara (*Punica granatum* L.), Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2013.
25. Mandić V. Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani, Diplomski rad, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2017.
26. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as Measure of "Antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996;239,70-76.
27. Generalić I, Skroza D, Šurjak J, Smole Možina S, Ljubenković I, Katalinić A et al. Seasonal Variations of Phenolic Compounds and Biological Properties in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem biodiv.* 2012;9(2):441-457.