

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala

Perković, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:996849>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marijana Perković

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marijana Perković

Primjena niskotemperaturnih eutektskih otapala za
ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Marko Rogošić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Marko Rogošić

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Zagreb, lipanj 2019.

Zahvala

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marku Rogošiću na predloženoj temi, mentorstvu, stručnom vodstvu i brizi tijekom pisanja ovog završnog rada. Također zahvaljujem prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević, mag. pharm. na svim savjetima, trudu i pomoći tijekom izrade rada.

Veliko hvala asistenticama Kristini Zagajski Kučan, mag. ing. cheming. i Mateji Mervić, mag. pharm. na iznimnom trudu, dobroj volji i susretljivosti koju su uložile tijekom eksperimentalnog dijela rada te pomoći oko svih nedoumica koje sam imala kod izrade diplomskog rada.

Također želim zahvaliti cijelom Zavodu za farmakognoziju, kolegicama i profesoricama koje sam upoznala tijekom obavljanja eksperimentalnog dijela, koje su mi svojim smijehom i prisutnošću uljepšali dane u laboratoriju.

Od srca želim zahvaliti obitelji i zaručniku na neizmjerne podršci, strpljenju i ljubavi koju su mi pružali u svakom trenutku mog života te svima koji su bili uz mene tijekom školovanja.

Marijana Perković

PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLA IZ BILJNOG MATERIJALA

Sažetak

U ovom radu cilj je odrediti jesu li odabrana niskotemperaturna eutektička otapala bolja za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala od najčešće korištenih konvencionalnih otapala. Konvencionalna otapala koja pronalaze uporabu u različitim industrijama nastoje se zamijeniti zbog njihove hlapljivosti, toksičnosti, zapaljivosti i cijene.

Iz dvije različite biljke (bazga i ružmarin), odnosno iz dva različita dijela tih biljaka (usitnjeni cvijet bazge i usitnjeni list ružmarina) ekstrahirane su odabrane skupine polifenola (fenolne kiseline i flavonoidi) po propisima Europske farmakopeje te su kvantitativno određene spektrofotometrijskom metodom. Prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida potvrđena je tankoslojnom kromatografijom. Osam različitih otapala uspoređeno je s obzirom na ekstrakciju polifenolnih spojeva (destilirana voda, 70 %-tni etanol, 100 % ChCl:EG = 1:3, 70 % ChCl:EG = 1:3, 50 % ChCl:EG = 1:3, 100 % ChCl:Gly = 1:3, 70 % ChCl:Gly = 1:3, 50 % ChCl:Gly = 1:3)

Za razliku od konvencionalnih otapala, niskotemperaturna eutektička otapala na bazi kolin-klorida, etilen-glikola i glicerola odabrana za ovaj diplomski rad pripadaju skupini zelenih otapala. Ispitivan je utjecaj proton-donorske skupine za ekstrakciju polifenolnih spojeva.

Rezultati ovog istraživanja pokazala su da primijenjena niskotemperaturna eutektička otapala s 50 % sadržajem vode vrlo dobro ekstrahiraju fenolne kiseline kao što su ružmarinska i klorogenska kiselina, dok sva korištena otapala zanemarivo malo ekstrahiraju flavonoide iz biljaka u usporedbi sa 70 %-tnim etanolom.

Ključne riječi: DES, konvencionalna otapala, zelena otapala, ekstrakcija, fenolne kiseline, flavonoidi

APPLICATION OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR THE EXTRACION OF POLYPHENOLSFROM PLANT MATERIAL

Summary

The main objective of this thesis is to determine if selected deep eutectic solvents are better for the extraction of polyphenols from herbal material than most commonly used conventional solvents. Conventional solvents which are used in many different industries are attempted to be replaced because of their volatility, toxicity, flammability and price.

The selected groups of polyphenols (phenolic acids and flavonoids) were extracted from two different herbs (elderberry and rosemary), i.e. from two different parts of those herbs (milled dry elderberry flowers and milled dry rosemary leaves) according to European pharmacopoeia regulations and quantitatively determined by the spectrophotometric method. The presence of phenol acids and flavonoids is confirmed by the thin layer chromatography

Eight different solvents were compared considering the extraction of polyphenol compounds (distilled water, 70 % ethanol, 100 % ChCl:EG = 1:3, 70 % ChCl:EG = 1:3, 50 % ChCl:EG = 1:3, 100 % ChCl:Gly = 1:3, 70 % ChCl:Gly = 1:3, 50 % ChCl:Gly = 1:3).

Unlike conventional solvents, deep eutectic solvents based on choline chloride, ethylene glycol and glycerol selected for this thesis belong to the group of green solvents. The impact of proton donor group on the extraction of polyphenol compounds is examined.

The results of this study show that the deep eutectic solvents with 50 % water content are very efficient in extracting phenolic acids such as rosemary acid and chlorogenic acid, while all used solvents exhibit negligible extraction of flavonoids from plants in comparison with 70 % ethanol.

Keywords: DES, conventional solvents, green solvents, extraction, phenolic acids, flavonoids

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	3
2.1. Organska otapala.....	3
2.1.1. Etanol.....	4
2.2. Niskotemperaturna euteksička otapala	5
2.2.1. Kolin-klorid	6
2.2.2. Etilen-glikol	7
2.2.3. Glicerol.....	8
2.3. Botanička obilježja biljaka	9
2.3.1. Botanička obilježja bazge	9
2.3.2. Botanička obilježja ružmarina	10
2.4. Polifenolni spojevi	11
2.4.1. Fenolne kiseline.....	11
2.4.2. Flavonoidi	12
2.4.3. Trjeslovine	13
2.4.4. Antocijani.....	15
3. Eksperimentalni dio.....	17
3.1. Biljni materijal.....	17
3.2. Instrumenti i pribor	18
3.3. Kemikalije i reagensi.....	19
3.4. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC).....	20
3.4.1. Priprema ispitivane i poredbene otopine	20
3.4.2. Ispitivanje tankoslojnom kromatografijom (TLC).....	20
3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola.....	22
3.5.1. Određivanje fenolnih kiselina.....	22
3.5.2. Određivanje flavonoida	25
3.5.3. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina	27
3.5.4. Određivanje antocijana	29
3.6. Priprava DES-a	31
3.7. Ekstrahiranje različitim otapalima.....	32
3.8. Statistička analiza	34
4. Rezultati.....	35

4.1.	TLC karakterizacija polifenolnih sastavnica	35
4.1.1.	Kvalitativna analiza biljaka	36
4.2.	Kvantitativna fitokemijska analiza polifenola.....	39
4.2.1.	Fenolne kiseline u cvijetu bazge.....	39
4.2.2.	Fenolne kiseline u listu ružmarina.....	39
4.2.3.	Flavonoidi u cvijetu bazge i listu ružmarina	40
4.2.4.	Antocijani u cvijetu bazge i listu ružmarina.....	41
4.2.5.	Ukupni polifenoli i trjeslovine	42
5.	Zaključak.....	52
6.	Popis simbola.....	53
7.	Popis literature	54
8.	Prilozi	57

1. Uvod

Posljednjih godina sve veći negativni učinci na okoliš i ljude, poput onečišćenja zraka, tla i vode, te promjena klime na globalnoj razini posljedica su nekontrolirane primjene raznih štetnih tvari koje se izravno ili neizravno koriste u kemijskoj, petrokemijskoj, farmaceutskoj, biotehnološkoj i agrokemijskoj industriji. Primjerice, hlapljiva organska otapala čine gotovo 2/3 svih industrijskih emisija širom svijeta, pri čemu je većina toksična, zapaljiva i korozivna, dok je njihovo recikliranje i ponovna uporaba povezana s energetski zahtjevnom destilacijom uz znatne gubitke. Stoga akademska zajednica pridaje veliku pozornost pronalasku novih, ekološki prihvatljivih i neškodljivih otapala. [1]

Konvencionalna organska otapala, kao što su metanol, heksan, etil acetat i aceton, naširoko se primjenjuju u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz prirodnih medicinskih biljaka. [2] Međutim, uobičajeno primjenjivana organska otapala uglavnom su hlapljiva, toksična i zapaljiva. Ona uzrokuju ozbiljno onečišćenje okoliša. [3] Onečišćenje okoliša i neprihvatljivi ostaci, koji proizlaze iz upotrebe velikih količina organskih otapala, izazvali su veliku zabrinutost i stavili „zelenu ekstrakciju“ u središte pozornosti farmaceutske i prehrambene industrije. [2]

Niskotemperaturna eutektička otapala (DES, engl. *deep eutectic solvents*) nastala su kao alternativa konvencionalnim ionskim kapljevinama i organskim otapalima zbog svojih jedinstvenih svojstava. Eksperimenti s različitim DES-ovima i obrada eksperimentalnih rezultata metodom analize glavnih komponenata pokazuju da je djelotvornost nekih DES-ova veća nego konvencionalnih otapala pri ekstrakciji flavonoidnih glikozida i aglikona. [2] S obzirom na njihov manji utjecaj na okoliš i nižu cijenu, DES-ovi su primjenjivani i pri ekstrakcijskom pročišćavanju ili separaciji komponenata biodizela, DNA i bioaktivnih spojeva. [2] Ipak, broj radova o primjeni DES-a za istovremenu ekstrakciju polarnih i nepolarnih komponenata iz prirodnih proizvoda i dalje je ograničen, a još uvijek nema puno informacija o izdvajanju ekstrahiranih spojeva iz pripremljenih ekstrakata na bazi DES-ova. [2]

U ovom su radu kvantitativno određeni ukupni polifenolni spojevi, antocijani, fenolne kiseline, flavonoidi i trjeslovine u usitnjenom cvijetu bazge i listu ružmarina. Uspoređene su djelotvornosti konvencionalnog otapala, destilirane vode i pripremljenih niskotemperaturnih

eutektičkih otapala pri ekstrakciji fenolnih kiselina i flavonoida iz ta dva biljna pripravka. Istraženo konvencionalno otapalo je 70 %-tni etanol, a niskotemperaturna eutektička otapala su kolin-klorid – etilen-glikol (ChCl-EG) i kolin-klorid – glicerol (ChCl-Gly) u molarnom omjeru 1:3 bez dodatka vode, te uz dodatak vode u volumnom udjelu od 30 % i 50 %. Kolin-klorid je akceptor vodikove veze (HBA), a etilen-glikol i glicerol su donori vodikove veze (HBD).

Eksperimenti i mjerenja provedena su u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i u Zavodu za fizikalnu kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na Marulićevom trgu 20 u Zagrebu.

2. Teorijski dio

Zašto su biljke i njihovi ekstrakti još uvijek važni u farmaciji i medicini? Povijesno gledano, od biljaka su dobiveni neki od najvažnijih lijekova, ali s velikim napretkom u medicinskoj kemiji prošlog stoljeća, zamijenile su ih sintetičke droge kao glavni fokus istraživanja. Međutim, nastavlja se razvoj lijekova koji koriste prirodne proizvode kao djelatne molekule, a mnogi čisti spojevi (ili prirodni proizvodi) dobiveni iz biljaka koriste se u modernoj, konvencionalnoj medicini. Drugi pak spojevi mogu biti korisni ili toksični za ljude. [4]

Znanje o biljnim produktima bitno je u svim područjima zdravstvene skrbi, ne samo zato što su oni popularni i široko korišteni (često kao bezreceptni proizvodi), nego i zbog njihove dokazane važnosti u liječenju mnogih bolesnih stanja. [4]

Za ekstrakciju komponenata iz biljnih proizvoda najčešće se primjenjuju etanol, metanol i aceton – organska otapala. [5] Kao što je dobro poznato, konvencionalna organska otapala odgovorna su za onečišćenje okoliša zbog njihove zapaljivosti i hlapljivosti. [5] Štoviše, mnoga uobičajena otapala često su otrovna, zapaljiva i/ili korozivna. Njihova nestabilnost i topljivost doprinijeli su onečišćenju zraka, vode i zemljišta, povećali rizik izloženosti radnika i doveli do ozbiljnih nesreća. Oporaba i ponovna upotreba otapala, kada je to moguće, često se povezuje s energetski intenzivnom destilacijom, a ponekad i unakrsnom kontaminacijom. U nastojanju da riješe sve te probleme, kemičari su započeli potragu za sigurnijim rješenjima. Stoga, od velikog značenja može biti razvoj novih zelenih ekstrakcijskih sredstava. [3] Sustavi bez otapala, voda, nadkritični fluidi (engl. *supercritical fluids*, SCF) i ionske kapljevine neki su primjeri tih novih, „zelenih“ odgovora. [6] Posljednjih godina pojavljuju se i niskotemperaturna eutektička otapala (DES) kao izvrsna alternativa uobičajenim organskim otapalima. [5]

2.1. Organska otapala

Uobičajena organska otapala klasificiraju se kao alifatski ugljikovodici, ciklički ugljikovodici, aromatski ugljikovodici, halogenirani ugljikovodici, ketoni, amini, esteri, alkoholi, aldehidi i eteri. Organska otapala su kemikalije koje otapaju druge kemikalije, a također su i lipofilna. [7] Najčešće su primjenjivana otapala u industriji, čime se uzrokuje ozbiljno onečišćenje

okoliša, a izloženost ljudi tim otapalima u industrijskom svijetu gotovo je sveprisutna. Koriste se u kemijskoj sintezi, kod kemijskog čišćenja (npr. tetrakloretilen), kao razrjeđivači boja (npr. toluen, terpentini), u sredstvima za uklanjanje laka za nokte, u otapalima ljepila (npr. aceton, metil-acetat i etil-acetat), kao sredstva za uklanjanje mrlja (npr. heksan, benzinski eter), deterdžentima (citrusni terpeni) i u parfemima (etanol). Pokazalo se da izlaganje miješanim organskim otapalima uzrokuje oštećenje bubrega kod štakora te da je povezano s različitim glomerularnim bolestima. [7]

Istraživanje na 125 žena provedeno u Kanadi 1999. pokazalo je da je ženama koje su na radnom mjestu bile izložene otapalima tijekom prvog tromjesečja trudnoće 13 puta veća šansa da rode djecu s velikim malformacijama u usporedbi s ženama koje nisu bile izložene otapalima. Žene u istraživanju uključivale su tvorničke radnice, laboratorijske tehničarke, umjetnice, grafičke dizajnerice i radnice u tiskarskoj industriji. Broj spontanih pobačaja kod izloženih žena tijekom rada s organskim otapalima bio je veći nego kod radnica koje nisu bile izložene otapalima. [7] Upotreba organskih otapala uključuje dodatne korake pročišćavanja kako bi se izdvojilo ekstrakcijsko otapalo iz ekstraktne i rafinatne faze i pročistilo za ponovnu uporabu. Svi ti čimbenici zahtijevaju veću potrošnju energije i povećavaju investicijske troškove. [8]

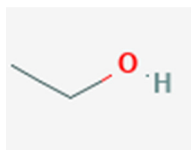
2.1.1. Etanol

Etanol je bistra, bezbojna i zapaljiva tekućina, ugodna mirisa i jetka okusa koja gori slabo svjetlećim plamenom. Molekulska formula je $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ili $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, a molarna masa je 46.069 g/mol. [9] Strukturna formula etanola prikazana je na slici 1. Vrelište mu je 78,3 °C, a gustoća 0,789 g/cm³. Pare etanola teže su od zraka. [9] Etanol je prirodni nusprodukt fermentacije biljaka i također se može proizvesti hidratacijom etilena.

Kapljeviti etanol isparava već pri sobnoj temperaturi, a pare su vrlo zapaljive i sa zrakom stvaraju eksplozivnu smjesu. Može se zapaliti plamenom, iskrom i pri dodiru s vrućom površinom. [10] Budući da je etanol učinkovit u ubijanju mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i virusi, čest je sastojak u mnogim dezinfekcijskim sredstvima za ruke. Također se koristi kao konzervans u kozmetičkim proizvodima.

Miješa se s vodom u svim omjerima, pri čemu se oslobađa toplina i smanjuje volumen. Dobro je otapalo za mnoge boje, masnoće i razne plastične tvari. [10] Važna je sirovina za sintezu

različitih spojeva. Kao dodatak hrani, etanol može pomoći ravnomjerno raspodijeliti bojilo u hrani te poboljšati okus ekstrakta hrane.



Slika 1. Strukturna formula etanola

2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *deep eutectic solvents*, DES) nastaju miješanjem dvije ili tri jeftine, „zelene“, biorazgradive komponente. Pri miješanju nastaje eutektička smjesa koja ima talište niže od svake pojedine komponente od kojih je DES sintetiziran. [5]

Mješljivost komponenata DES-a promoviraju međumolekulske vodikove veze koje pritom nastaju. DES-ovi su stoga obično smjese pripremljene kombiniranjem donora vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD) i akceptora vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor* HBA). [11] Najčešće nastaju miješanjem kvarternih amonijevih soli s različitim donorima vodikovih veza (HBD) kao što su alkoholi, organske kiseline, saharidi i aminokiseline. [5]

Kao nova vrsta otapala, niskotemperaturna eutektička otapala privlače veliku pozornost zbog svojih izvrsnih fizikalnih i kemijskih svojstava. Ne samo da dijele prednosti ionskih kapljevina (engl. *ionic liquids*, ILs), kao što su kemijska postojanost, nizak tlak para itd. nego u usporedbi s ionskim kapljevinama imaju i brojne prednosti kao što su raznolikost u dizajniranju eutektičke smjese, jeftine i lako dostupne sirovine te „zeleni“, jednostavni i ekološki prihvatljivi procesi pripreme bez upotrebe drugih organskih otapala, sigurnost, netoksičnost, biorazgradivost, održivost i niska cijena. [2, 3, 5] Pokazuju dobra fizikalno-kemijska svojstva kao što je podesiva viskoznost, zanemariva hlapljivost, širok raspon polariteta i visoka moć otapanja različitih spojeva. [5] U usporedbi s ionskim kapljevinama DES-ovi ponekad pokazuju znatno veću ekstrakcijsku djelotvornost. [3]

Zbog istovremene mogućnosti otpuštanja ili primanja elektrona ili protona iz vodikove veze DES-ovi pokazuju dobru moć otapanja mnogih tvari te im je u separacijskim procesima posvećena velika pozornost. [3] Posljednjih godina DES-ovi se široko primjenjuju u katalizi, organskoj sintezi, elektrokemiji i separacijskim procesima, s ciljem povećanja učinkovitosti i

smanjenja onečišćenja. Postoje i radovi o primjeni DES-a za ekstrakciju proteina, fenolnih spojeva, antocijana, astaksantina, saponina ginsenga, katehina, flavonoida i još puno toga. [5]

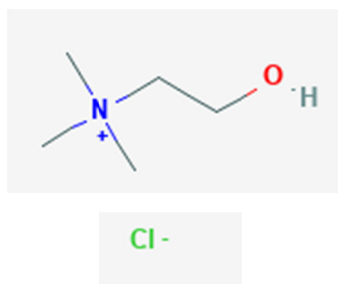
2.2.1. Kolin-klorid

Kolin-klorid je sol kolina, široko je rasprostranjen u prirodi te je biorazgradiv. [12] Kolin-klorid je bezbojni ili bijeli kristalni prah ili kristal s blagim mirisom amina (poput ribe). [13] Molekulska formula kolin-klorida je $C_5H_{14}ClNO$, a njegova molarna masa 139,63 g/mol. Talište mu je 247 °C. Topljiv je u vodi (800 g/L pri 25 °C) i etanolu, a netopljiv u eteru i benzenu. [12] Strukturna formula kolin-klorida je na slici 2. Kada se otopi u vodi disocira na pozitivno nabijen kolinski ion i negativno nabijen kloridni ion. [13] Vodene otopine kolin-klorida su gotovo pH-neutralne. Kolin-klorid dobiven kemijskom sintezom je vrlo higroskopan (upija vlagu iz zraka). [12]

Kolin-klorid se upotrebljava kao dodatak stočnoj hrani od tridesetih godina prošlog stoljeća. Dodaje se u krmne smjese, izravno u hranu ili u vodu koja se daje životinjama. [13] Higroskopna svojstva kolin-klorida mogu ga učiniti manje poželjnim od kolin-bitartarata za upotrebu u praškastim formulacijama, jer apsorbira vlagu iz zraka koja može smanjiti stabilnost ostalih komponenata u suhoj mješavini, osobito vitamina A, D i K te kada u mješavini ima i metalnih elemenata. Zbog higroskopnih svojstava kolin-klorida u mješavinama, takvi proizvodi trebaju biti pohranjeni na hladnom, tamnom i suhom mjestu i trebali bi se upotrijebiti u roku od tri mjeseca. [13]

Korištenje kolin-klorida u životinjskoj ishrani ne može znatno povećati njegovu koncentraciju u okolišu. Stoga nije procijenjen rizik za okoliš koji proizlazi iz uporabe kolin-klorida u životinjskoj ishrani. [12]

Kolin-klorid se dodaje kao djelomična zamjena i pojačivač okusa natrijeva klorida kako bi se smanjio sadržaj natrija u grickalicama, pecivima i drugim prerađenim organskim namirnicama. [13] Kolin-klorid se trenutno koristi kao prehrambeni izvor kolina u raznim trenutno prisutnim organskim suhim i konzerviranim namirnicama za kućne ljubimce, posebno onima namijenjenima psima i mačkama. [13]



Slika 2. Strukturna formula kolin-klorida

2.2.2. Etilen-glikol

Etilen-glikol, također nazvan etan-1,2-diol, najjednostavniji je član skupine glikola. To je bistra, slatka, blago viskozna tekućina bez mirisa koja vrije na 198 °C, strukturne formule prikazane na slici 3. Molarna masa etilen-glikola je 62,068 g/mol, a molekulska formula $C_2H_6O_2$. Otapa se u vodi, etanolu i acetonu. Pri normalnim temperaturama opasnost od isparavanja etilen-glikola i stvaranja eksplozivnih smjesa sa zrakom praktički je zanemariva. [14]

Američka uprava za hranu i lijekove (FDA) odobrila je etilen-glikol kao indirektni prehrambeni aditiv, koji se primjenjuje kao komponenta ljepila koje se koriste u pakiranju hrane. Primarna upotreba etilen-glikola je u proizvodnji plastomernog polietilen-tereftalata (PET) koji se koristi za izradu spremnika za napitke, sokove i vodu, te poliesterskih vlakana za odjeću, presvlake, tepih i jastuke. Zbog svojih se fizikalnih svojstava etilen-glikol upotrebljava kao osnova u sredstvima protiv smrzavanja (antifriz), za proizvodnju tekućina koje služe za hidrauličku transmisiju, u proizvodnji elektrolitnih kondenzatora, kao izmjenjivač topline, kao kemijski intermedijer za dobivanje glikol-estera, etilen-glikol-dinitrata, plastičnih masa, za proizvodnju farmaceutskih preparata, kao sredstvo za vlaženje, kao plastifikator, u proizvodnji dinamita, kao sredstvo za dehidraciju (sušenje plinova) itd. [14]



Slika 3. Strukturna formula etilen-glikola

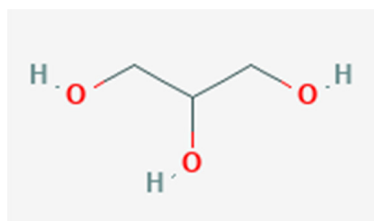
2.2.3. Glicerol

Glicerol ili propan-1,2,3-triol je prozirna i viskozna tekućina s blagim karakterističnim mirisom, slatkastog okusa, molekulske formule $C_3H_8O_3$ i molarne mase 92,094 g/mol, strukturne formule prikazane na slici 4. Često se kao sinonim koristi naziv glicerol. Glicerol ima tri hidroksilne skupine (trovalentni alkohol) koje su odgovorne za njegovu topljivost u vodi i njegovu higroskopnu prirodu. Nehlapiv je i može se isprati običnom vodom. Nastaje kao nusprodukt saponifikacije masti, a može se dobiti i sintetskim putem.

Čisti glicerol, ili glicerol, ima širok raspon primjena u prehrambenoj, farmaceutskoj, medicinskoj i osobnoj industriji, kao i različite znanstvene primjene. Nalazi se u sredstvima protiv kašlja (ekspektoransima), pastama za zube, sredstvima za ispiranje usta, proizvodima za njegu kože, kremama za brijanje, proizvodima za njegu kose, glicerolnim sapunima... U proizvodima za njegu kože najčešće se koristi kao humektans (ovlaživač) i regulator viskoznosti, a također ima i široku primjenu primjerice u proizvodima za oralnu higijenu (vodice za ispiranje usta) i njegu kose (regeneratori). Dodaje se u koncentraciji 2 – 5 % u proizvodima za njegu tijela.

Američka uprava za hranu i lijekove općenito ga smatra sigurnim. Mnoge namirnice također mogu biti izvori glicerina. Neki potencijalni izvori glicerina uključuju alkoholna pića, sok od jabuke i različite sirupe za razrjeđivanje vodom. Različiti dodaci hrani, kao što su umaci, ugušćeni ocat, senf, začini, sladila, maslac i slični namazi, te namazi od orašastih plodova mogu sadržavati glicerol, a ima ga i u bombonima, juhama i sladoledu. Hrana s dodatkom sladila ponekad sadrži glicerol zbog njegova slatkog okusa.

Glicerol se koristi za proizvodnju nitroglicerina koji je bitan sastojak bezdimnog baruta i raznih eksploziva kao što su dinamit, gelignit i potisna goriva poput kordita.



Slika 4. Strukturna formula glicerola

2.3. Botanička obilježja biljaka

2.3.1. Botanička obilježja bazge

Bazga (lat. *Sambucus nigra* L.) svrstana je u rod *Sambucus* i porodicu *Adoxaceae*. Malo je listopadno stablo koje naraste od 3 do 10 metara u visinu. Biljka počinje cvjetati tijekom druge godine nakon sadnje, a plodovi dolaze u trećoj godini. Bijelo ili kremasto cvijeće u grozdovima pokriva biljku tijekom ranog ljeta (slika 5). Nakon toga se pojavljuju male, okrugle, crne ili ljubičaste bobice od 8 do 10 mm koje mogu biti spremne za berbu od lipnja, a sezona traje do rujna. Bazga raste na rubovima šuma i osunčanim dijelovima šume, na zapuštenim mjestima i u blizini naselja. Potječe iz Europe, a danas je rasprostranjena širom svijeta. Da bi procvala potrebno je isušeno, pjeskovito i dušikom bogato tlo. Jedino su cvijeće i zrele bobice bazge jestive. Ostali dijelovi biljaka, uključujući njezinu koru, list i korijen sadrže visoke razine toksičnih alkaloida te ih treba izbjegavati.

Cvat bazge smatran je manje važnim od ploda; međutim, može predstavljati vrijedan izvor fenolnih kiselina i flavonoida. [15] Od cvjetova bazge mogu se pripravljeni infuzije, sokovi, sirupi, likeri, šabese (tradicionalni, bezalkoholni slatki napitci) i jogurti. [15] Za ekstrakt cvijeta bazge poznato je da sadrži antikataralna, diuretska i protuupalna svojstva. [15] Sok od bazge već se generacijama koristi kao lijek protiv prehlade, gripe i herpesa. [16]



Slika 5. Cvijet bazge

2.3.2. Botanička obilježja ružmarina

Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis* L.) pripada porodici *Lamiaceae* i rodu *Rosmarinus*. Danas se uzgaja u gotovo svim dijelovima Sredozemlja i Male Azije kao važna kulinarska biljka. To je grmolika zimzelena biljka za koju se vjeruje da potječe s Mediterana. [17] Ružmarin cvjeta u dobro isušenom, alkalnom tlu. Preferira sunčane uvjete, ali u isto vrijeme treba zaklon od olujnih vjetrova. Biljka doseže od 1,5 do 3 metra u visinu. Njegove čupave stabljike i mladi izbojci prekriveni su oko 1 cm dugim, uskim, aromatičnim listićima nalik iglama, tamno-zelenima s gornje i sivkastima s donje strane. Biljka nosi kratke grozdove malih morsko-plavih cvjetova. Cvate od svibnja do lipnja u mediteranskoj klimi, a plodove daje između proljeća i ljeta. [17] Plod je kalavac koji se dijeli (kala) na dva smeđa oraščića. Cijela biljka jakog je i aromatičnog okusa. Igličasti listovi (slika 6) intenzivnog su mirisa, te pikantno ljutog, oporog i gorkog okusa. Upotrebljava se za aromatiziranje povrća i mesnih jela.

U lokalnoj i tradicionalnoj medicini služi za tretman bolesti povezanih s upalama. [17] Dijelovi biljaka, posebno cvjetni vrhovi, sadrže fenolni antioksidansi – ružmarinsku kiselinu, kao i brojne komponente hlapljivih eteričnih ulja kao što su cineol, kamfen, borneol, bornil-acetat, α -pinen itd. Ti spojevi djeluju kao rubefacijensi, imaju protuupalna, antialergijska, antifungalna i antiseptička svojstva. Čaj od ružmarina je prirodni lijek protiv glavobolje izazvane nervozom, prehlade i depresije. Ružmarin je bogat izvor vitamina skupine B-kompleksa, osobito folne kiseline, pantotenske kiseline, piridoksina i riboflavina, zatim vitamina A i C te minerala kalija, kalcija, željeza, magnezija, bakra i mangana.



Slika 6. List ružmarina

2.4. Polifenolni spojevi

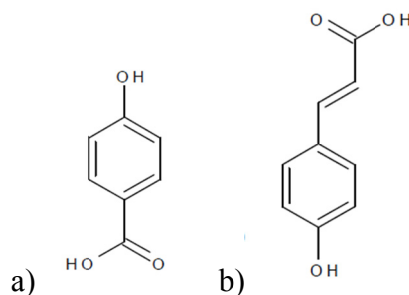
Fenoli obuhvaćaju skupinu od više tisuća prirodno prisutnih spojeva, od kojih svi imaju jednu zajedničku strukturnu značajku, a to je fenol (aromatski prsten koji nosi najmanje jedan hidroksilni supstituent). Sadašnja klasifikacija dijeli široku kategoriju fenola na polifenole i jednostavne fenole, temeljeći se isključivo na broju prisutnih fenolnih podjedinica. [18] U posljednjih nekoliko desetljeća fenolni spojevi privukli su veliku pozornost akademske zajednice zbog njihovih prepoznatih bioaktivnih svojstava. [19]

Polifenolni spojevi su bioaktivne tvari prisutne u biljkama, voću i povrću koje iskazuju snažna antioksidativna svojstva i prehrambene učinke. [3] Njihova visoka antioksidacijska djelotvornost pozitivno utječe na zdravlje ljudi, a može sprječavati razvoj raka i inhibirati oksidacijski stres. [15] Fenolni spojevi imaju različite farmakološke učinke: djeluju antivirusno, antibakterijski, protuupalno i antikancerogeno. [15]

Polifenolni spojevi upotrebljavaju se kao sirovine u proizvodnji kozmetike i boja, kao bojila i arome u prehrambenoj industriji, kao funkcionalni sastojci u dodacima prehrani, kao konzervansi za produljenje roka trajanja formuliranih proizvoda, a široko se primjenjuju i u zdravstvenoj i farmaceutskoj industriji. [20]

2.4.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su sekundarni aromatski metaboliti biljaka. [18] Naziv "fenolne kiseline" općenito opisuje fenole koji imaju jednu karboksilnu skupinu. [18] Fenolne kiseline koje se pojavljuju u prirodi dijele se na temelju strukture na: derivate benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁) (slika 7a) i derivate cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline, C₆-C₃) (slika 7b). [18]



Slika 7. Fenolne kiseline; a) hidroksibenzojeva kiselina, b) cimena kiselina

Fenolne kiseline su druge po redu po zastupljenosti fenolnih spojeva nakon flavonoida. Najčešće se nalaze u obliku glikozida, estera i etera, a male količine su prisutne u slobodnom obliku. Fenolne kiseline su važne za boju, miris, nutritivne vrijednosti i antioksidativna svojstva hrane. Osim što štite od slobodnih radikala pokazuju antikancerogeno, protuvirusno i antibakterijsko djelovanje, smanjuju alergijske reakcije te poboljšavaju imunološki sustav.

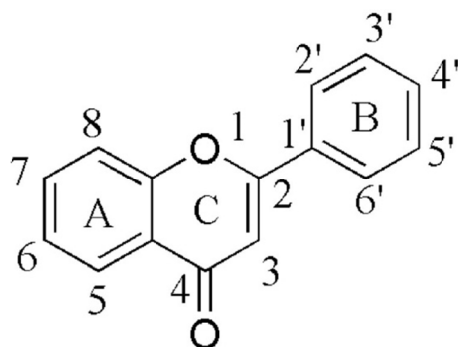
Najpoznatiji predstavnici derivata hidroksibenzojeve kiseline su: benzojeva, salicilna, vanilinska, galna i protokatehinska kiselina, a derivata hidroksicimetne kiseline: cimetna, kavena, *o*-kumarinska, *p*-kumarinska, ferulinska i sinapinska kiselina. [18] Ružmarinska i klorogenska kiselina su esteri kavene kiseline i vrlo često se nalaze u biljkama. [21]

Ružmarinska kiselina je ester kavene i 3,4-dihidroksifenillaktatne kiseline. [22] Pokazuje antioksidativna, protuupalna, antimutagena, antimikrobna i protuvirusna svojstva te pomaže kod alergijskih tegoba. Nalazi se u biljkama kao što su *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), *Salvia officinalis* (kadulja), *Mentha piperita* (paprena metvica), *Thymus vulgaris* (majčina dušica, timijan), *Melissa officinalis* (matičnjak).

Klorogenska kiselina je ester kavene i kininske kiseline. Češća je u prirodi od ružmarinske kiseline. Nalazi se u sjemenkama, lišću i voću te zrnu zelene kave. Toplinski je nestabilna i razgrađuje se na kavenu i kininsku kiselinu. [23]

2.4.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća skupina prirodnih polifenolnih spojeva. Do sada je zabilježeno više od 9000 flavonoida. [24] Flavonoidi se u prirodi često nalaze u glikoziliranom ili esterificiranom obliku. [24] Nalaze se u voću, povrću, žitaricama, kori, korijenju i stabljikama biljaka, cvijeću, čaju i vinu. [25] Osnovnu strukturu flavonoida čine dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem, uglavnom s atomom kisika u poveznici (C₆C₃C₆) (slika 8.). [24]



Slika 6. Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi doprinose mnogim bojama koje se nalaze u prirodi, osobito žutoj i narančastoj u laticama; čak i bezbojni flavonoidi apsorbiraju svjetlost u UV-spektru (zbog velikih kromofora) i vidljivi su mnogim insektima. [4] Stoga vjerojatno imaju veliku ekološku važnost u prirodi kao boje koje privlače insekte i ptice te tako pomažu u oprašivanju biljaka. [4]

Zbog svojih povoljnih bioaktivnih učinaka, uključujući antivirusno, antibakterijsko, protuupalno, kardioprotektivno, antidijabetičko i antikancerogeno djelovanje odavno su predmet brojnih istraživanja. [27]

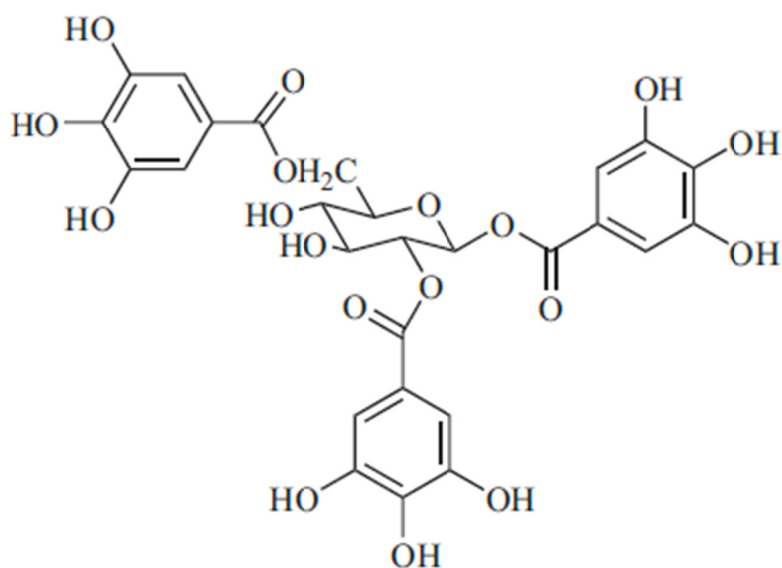
Neki flavonoidi znatno utječu na okus hrane. [4] Njihova nutritivna vrijednost proizlazi iz činjenice da su jaki antioksidansi, kao i drugi fenolni spojevi. Poznato je da se mnoga bolesna stanja pogoršavaju zbog prisutnosti slobodnih radikala kao što su superoksidni ili hidroksilni radikal, a flavonoidi imaju sposobnost učinkovitog uklanjanja tih štetnih oksidirajućih vrsta. Hrana bogata flavonoidima stoga se predlaže kao pomoć pri liječenju bolesti kao što su rak i srčane bolesti. [4] Flavonoidi se danas smatraju nezamjenjivom komponentom u raznim nutritivnim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim primjenama. [25]

2.4.3. Trjeslovine

Osim flavonoida, trjeslovine ili tanini su još jedna klasa prirodnih proizvoda koja daje trpkost i gorčinu u biljkama i hrani. [4] Ta skupina obuhvaća polifenolne spojeve topive u vodi, koji mogu imati visoku molekulsku masu. [4] Trjeslovine ili tanini prirodni su organski spojevi i nalaze se u kori drveta, lišću, šišarkama i dr. Široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu i biljke ih proizvode kao sredstva odvratanja od hranjenja; njihovim vezanjem za proteine

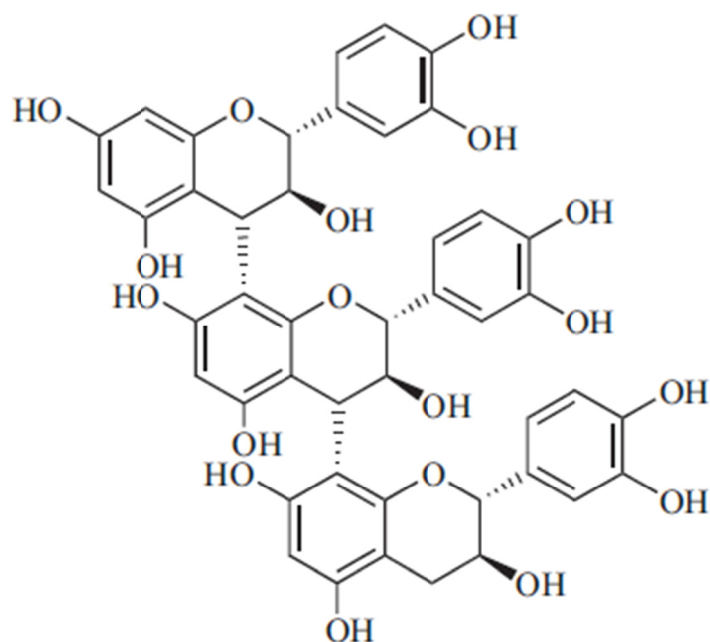
smanjuje se prehrambena vrijednost biljke kao hrane. [4] Ključno obilježje trjeslovina je njihova sposobnost vezivanja za proteine. [4]

Trjeslovine se dijele u dvije skupine. Prva skupina su trjeslovine koje hidroliziraju, a nastaju esterifikacijom šećera (npr. glukoza) s jednostavnim fenolnim kiselinama (npr. galna kiselina). Takve strukture (slika 9.) sadrže nekoliko molekula fenolnih kiselina koje su esterskim vezama povezane za središnju molekulu šećera.



Slika 7. Trjeslovina koja hidrolizira

Trjeslovine koje ne hidroliziraju, a ponekad se nazivaju kondenziranim trjeslovinama, nastaju uslijed reakcija polimerizacije (kondenzacije) flavonoida. [4] Kondenzirane trjeslovine ne hidroliziraju na jednostavnije molekule pod utjecajem mineralnih kiselina ili enzima. Primjer je prikazan na slici 10.



Slika 8. Trjeslovina koja ne hidrolizira

Upotrebljavaju se u proizvodnji kože i tinte te su sastojci štavila. Koriste se i za tamnjenje kože, daju karakterističan gorak okus pivu i služe za formuliranje adstringentnih pripravaka u farmaciji. [4] Najvažnija upotreba trjeslovina veže s njihovim adstringentnim učinkom, te se upotrebljavaju kod brojnih bolesti.

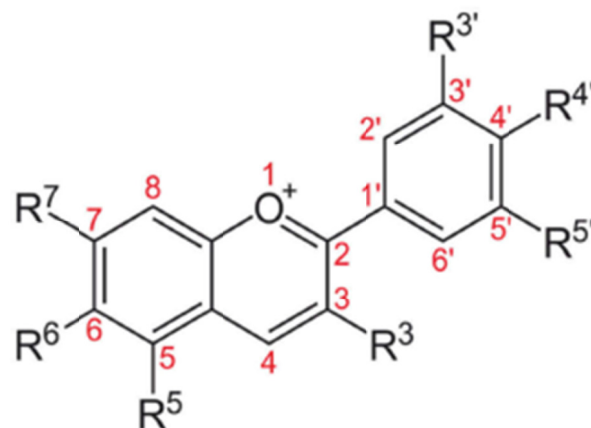
2.4.4. Antocijani

Riječ antocijan dolazi od dvije grčke riječi, *anthos* (cvijet) i *kyanos* (plavo). Antocijani su grupa biljnih pigmenata topivih u vodi, plave, crvene ili ljubičaste boje. [26] Nalaze se u biljkama, najviše u cvijeću, voću, povrću i gomoljima. U kiselim uvjetima, antocijani se pojavljuju kao crveni pigmenti, dok se plavi pigment antocijana pojavljuje u alkalnim uvjetima kada pH poraste. Na boju i stabilnost tih pigmenata utječu pH, svjetlo, temperatura i struktura. [26] Antocijani pripadaju flavonoidima koji uključuju flavonole, flavone, katehine i flavonone. [16] Najčešće se ekstrahiraju iz grožđa, višanja, crvenog kupusa, te iz bobica bazge ili crnog ribiza.. Među antocijanskim pigmentima ističe se cijanidin-3-glukozid koji se nalazi u većini biljaka.

Uloga pigmenata nije u potpunosti objašnjena, no smatra se da služe privlačenju insekata i drugih životinja, u svrhe oprašivanja i raznošenja sjemena. Osim tradicionalne uporabe, crveni, ljubičasti i plavo obojeni plodovi najčešće se konzumiraju zbog svojih blagotvornih učinaka. Obojeni pigmenti antocijana iz bobica, crnog ribiza i drugih vrsta crvenih do plavo obojenih plodova su jaki antioksidansi, tj. tvari koje sprječavaju razvoj srčanih bolesti i raka. U zadnje se vrijeme povezuju i s drugim zdravstvenim učincima kao što je npr. snižavanje razine glukoze u krvi dijabetičara. Crna mrkva, crveni kupus i ljubičasti krumpir bogati antocijanima potencijalne su funkcionalne namirnice koje se konzumiraju za prevenciju bolesti. [27]

Antocijanska bojila pripadaju fenolnoj skupini bojila. Pigmenti se nalaze u glikoziliranim oblicima. Obojeni antocijanski pigmenti tradicionalno se koriste kao prirodno bojilo za hranu.

Na slici 11. prikazana je osnovna molekulska struktura antocijana.



Slika 9. Osnovna molekulska struktura antocijana

3. Eksperimentalni dio

3.1. Biljni materijal

Osušeni cvjetovi bazge (*Sambucus nigra* L.) i listovi ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) korišteni u eksperimentalnom djelu nabavljeni su na hrvatskom tržištu od tvrtke Suban. Potvrda identiteta istraživanih biljnih materijala provedena je u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Biljni materijal propisno je čuvan pri sobnoj temperaturi, zaštićen od svjetlosti. Za potrebe istraživanja biljni materijal cvijeta bazge i lista ružmarina usitnjen je u prašak (slika 12.).



Slika 10. Osušeni i usitnjeni cvjetovi bazge (lijevo) i listovi ružmarina (desno)

3.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti HPTLC silikagel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar Helios γ (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- magnetna mješalica s grijačem (uniSTIRRER 3, LLG Labware, Meckenheim, Njemačka)
- laboratorijska centrifuga (Hettich, EBA 3S, Njemačka)
- sušionik (Beko, OIE 22300, Turska)

3.3. Kemikalije i reagensi

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska);
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- β -aminoetilni ester difenilborne kiseline (Fluka, Buchs, Švicarska);
- etanol 96 % *p.a.* (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska);
- etil-acetat *p.a.* (Lach-Ner, Neratovice, Češka);
- etilen-glikol *p.a.* (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska);
- Folin-Ciocalteuov reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka);
- glicerol (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska);
- heksametilen-tetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- izokvercitrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- klorogenska kiselina, standard (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- kolin-klorid, 99% (Acros Organics, New Jersey, Sjedinjene Američke Države);
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- kvercitrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka);
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države);
- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev sulfat bezvodni (Zorka, Šabac, Srbija);
- octena kiselina $\geq 99,5$ % (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- pirogalol 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- polietilen-glikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska);
- rutin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- ružmarinska kiselina, standard (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- solna (klorovodična) kiselina 37 % (Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija);

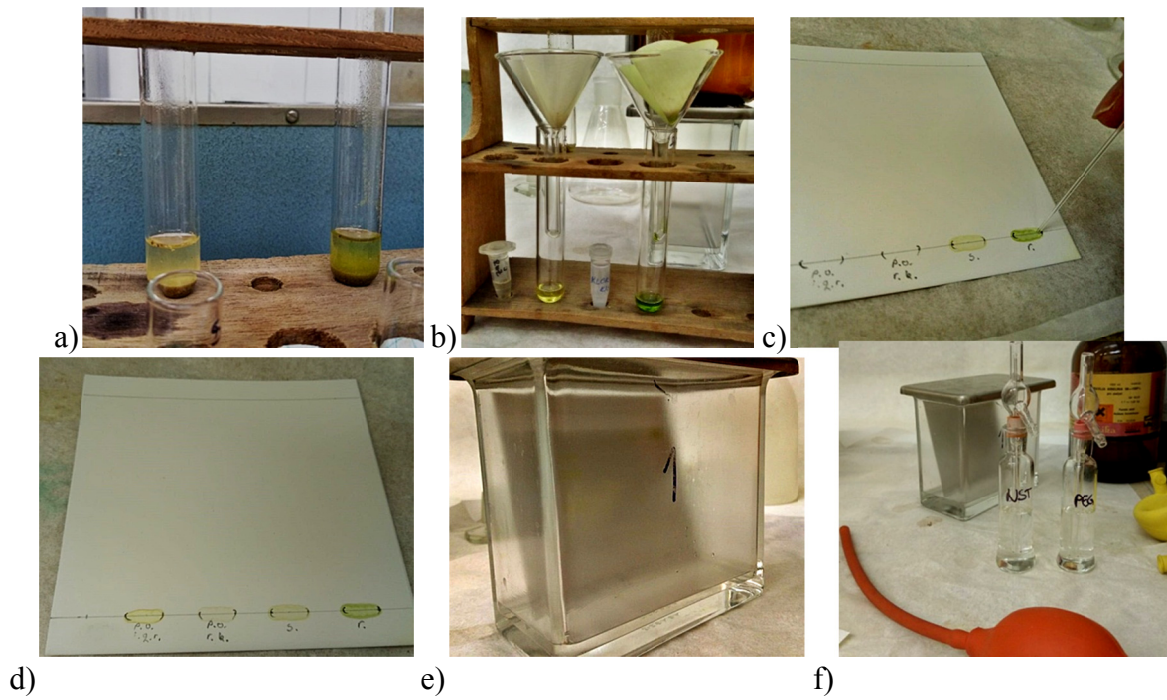
3.4. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

3.4.1. Priprema ispitivane i poredbene otopine

Biljni materijali cvijeta bazge i lista ružmarina samljeveni su u prah. 0,2 g praškastog uzorka stavljeno je u epruvetu i ekstrahirano 5 minuta u 2 mL metanola na vodenoj kupelji (60 °C) (slika 13a) te filtrirano preko filter-papira (slika 13b). Dobiveni filtrati služili su za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina. Za poredbenu otopinu otopljeno je po 2,5 mg flavonoidnih glikozida (rutina, kvercitrina i izokvercitrina) u 10 mL metanola te poredbenih supstancija klorogenske i ružmarinske kiseline. [28]

3.4.2. Ispitivanje tankoslojnom kromatografijom (TLC)

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina u pripremljenim ekstraktima provedeno je na tankom sloju silikagela Kieselgel 60 F254. Na ploču su pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) naneseni uzorci i otopine standarda (10 µL) (slika 13c i 13d). Kao pokretna faza za odjeljivanje flavonoidnih glikozida i standarda fenolnih kiselina korištena je smjesa etil-acetata, mravlje kiseline, ledene octene kiseline i vode u volumnim omjerima 100:11:11:27 (V/V/V/V) Razvijena ploča (slika 13e) poprskana je 1 %-tnom metanolnom otopinom β -aminoetilnog estera difenilboratne kiseline i 5 %-tnom metanolnom otopinom polietilen-glikola (NST/PEG) (slika 13f.). Nakon sušenja na zraku dobiveni kromatogrami promatrani su pod UV-svjetlom pri 365 nm. [28]



Slika 11. Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom; (a) razmućivanje 0,2 g suhog biljnog materijala u metanolu; (b) filtracija nakon zagrijavanja na vodenoj kupelji; (c) nanošenje ispitivane i poredbene otopine kapilarom; (d) nanaseni uzorci; (e) razvijanje ploče; (f) prskanje razvijene ploče reagensima

3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola

3.5.1. Određivanje fenolnih kiselina

Određivanje sadržaja fenolnih kiselina u istraživanim biljnim uzorcima provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku. [29] Nakon što je suhi biljni materijal usitnjen u prah, u Erlenmeyerove tikvice s brušenim grlom od 250 mL stavljeno je 0,200 (ili 0,300) g praškasto usitnjenog uzorka i 80 (95) mL 50 %-tnog etanola (slika 14a), te je sadržaj zagrijavan 30 minuta na kipućoj vodenoj kupelji (slika 14b) uz povratno hladilo. Nakon hlađenja (slika 14c) i filtriranja (slika 14d), filtrat je u odmjerne tikvici razrijeđen 50%-tnim etanolom do 100 mL (slika 14e). Za pripremu ispitivane otopine uzet je 1 mL dobivenog ekstrakta u odmjernu tikvicu od 10 mL. Redom je dodano: 2,0 mL 0,5 M solne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdatnog reagensa, 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida te je sadržaj tikvice dopunjen vodom do oznake (slika 14f). Poredbena otopina za određivanje sadržaja ružmarinske kiseline pripremljena je dodatkom 1 ml ekstrakta u odmjernu tikvicu od 10 mL i razrjeđenjem destiliranom vodom do oznake. Za pripremu poredbene otopine za određivanje klorogenske kiseline 1 ml ekstrakta razrijeđen je u odmjerne tikvici od 10 mL, dodano je 2,0 mL 0,5 M solne kiseline, 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida te dopunjeno do oznake destiliranom vodom (slika 14g.). Izmjerena je apsorbancija ispitivane otopine pri 505 (ili 525) nm u odnosu na poredbenu otopinu (slika 14h.). Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao ružmarinska kiselina, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 2,5}{m}$$

uzevši u obzir da specifična apsorbancija ružmarinske kiseline pri 505 nm iznosi 400, A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine pri 505 nm, a m masu suhog biljnog materijala u gramima.

Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao klorogenska kiselina, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5,3}{m}$$

uzevši u obzir da specifična apsorbancija klorogenske kiseline pri 525 nm iznosi 188, A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine pri 525 nm, a m masu suhog biljnog materijala u gramima.

Sva mjerenja rađena su u triplikatu.



Slika 12. Određivanje fenolnih kiselina; (a) priprema uzorka za ekstrakciju; (b) ekstrakcija na vodenoj kupelji uz povratno hladilo; (c) hlađenje tikvice pod mlazom hladne vode; (d) filtriranje alkoholnog ekstrakta; (e) dopunjavanje 50 %-tnim etanolom do oznake; (f) reagensi; (g) priprema poredbena i ispitivane otopine; (h) mjerenje apsorbancije otopina

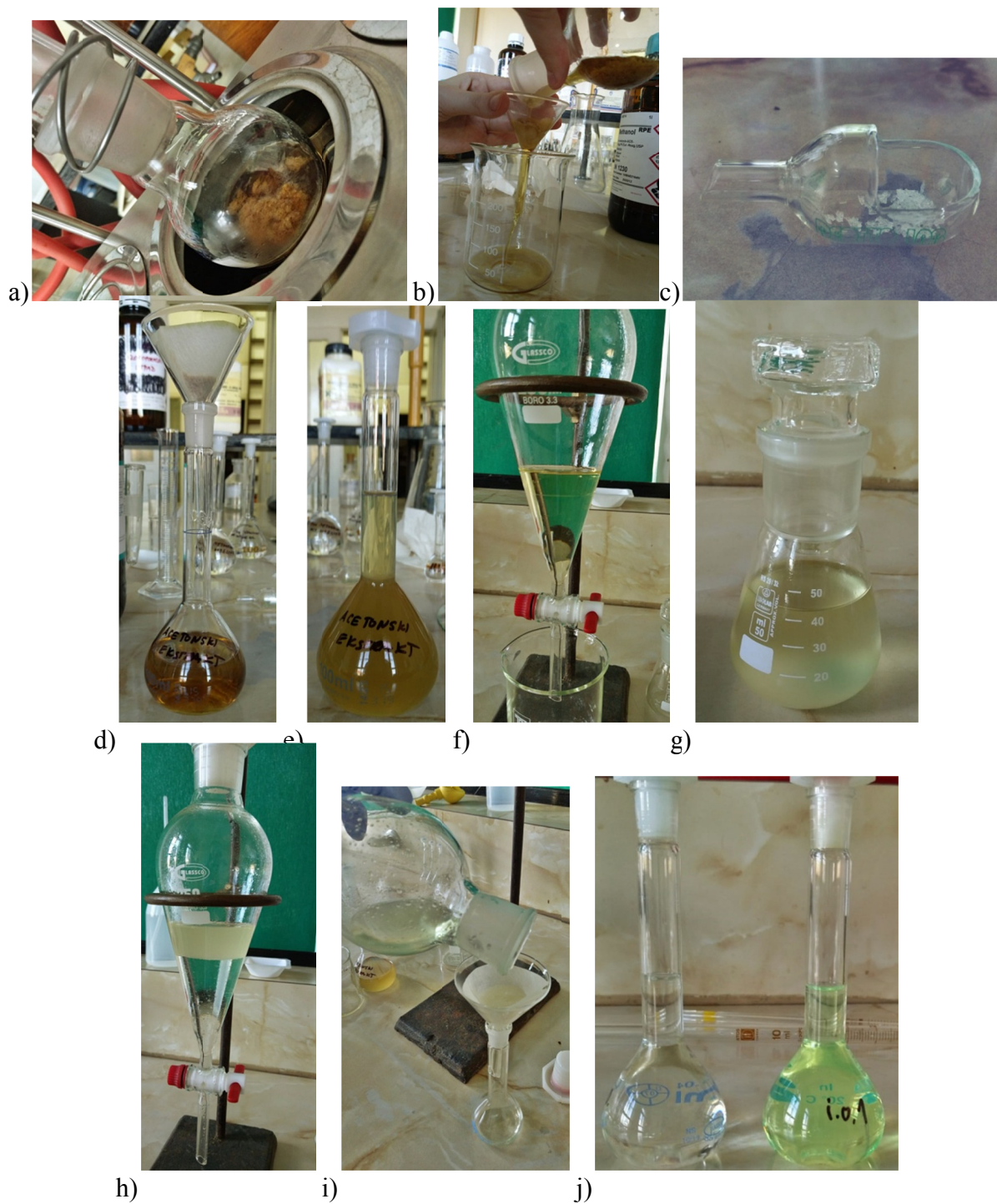
3.5.2. Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u istraživanim biljnim uzorcima provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku. [29] Nakon što je suhi biljni materijal usitnjen u prah, u tikvicu okruglog dna od 100 mL stavljeno je 0,600 g praha, 1 mL 5 g/L otopine heksametilen-tetramina, 20 mL acetona i 2 mL solne kiseline (250 g/L), te je sadržaj zagrijavan 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo (slika 15a). Sadržaj u tikvici filtriran je preko malo pamuka (slika 15b), a ostaci biljnog materijala u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) ponovno su ekstrahirani dva puta s po 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati filtrirani su preko filter-papira uz ispiranje tikvice i filter-papira (slika 15d), te je otopina razrijeđena acetonom do 100,0 mL (slika 15e). U lijevku za odjeljivanje preneseno je 20,0 mL acetonskog ekstrakta i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku prvo je izmućkivan s 15 mL etil-acetata, a zatim još tri puta s po 10 mL etil-acetata (slika 15f). Sjedinjeni etil-acetatni ekstrakti (slika 15g) dodatno su isprani u lijevku za odjeljivanje dva puta s 50 mL vode (slika 15h) te filtrirani preko 10 g bezvodnog natrijeva sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te je sadržaj nadopunjen etil-acetatom do oznake (slika 15i). 10,0 mL dobivenog etil-acetatnog ekstrakta pomiješano je s 1,0 mL reagensa aluminijskog klorida (2,0 g aluminijskog klorida heksahidrata (slika 15c) otopljeno u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline) u odmjernoj tikvici od 25,0 mL i razrijeđeno s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Za pripremu poredbene otopine 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta razrijeđeno je do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline (slika 15j). Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je nakon 30 minuta pri 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

uzevši u obzir da specifična apsorbancija izokvercetrozida pri 425 nm iznosi 500, A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine pri 425 nm, a m masu suhog biljnog pripravka u gramima.

Sva mjerenja rađena su u triplikatu.



Slika 13. Određivanje flavonoida; (a) ekstrakcija na vodenoj kupelji uz povratno hladilo; (b) filtracija preko pamuka; (c) priprema otopine reagensa AlCl_3 ; (d) filtracija acetonskog ekstrakta; (e) priprema acetonskog ekstrakta; (f) izmućkivanje s etil-acetatom ; (g) sjedinjeni etil-acetatni ekstrakti; (h) izmućkivanje s vodom; (i) filtriranje preko bezvodnog natrijeva sulfata; (j) poredbena i ispitivana otopina spremne za mjerenje apsorbancije

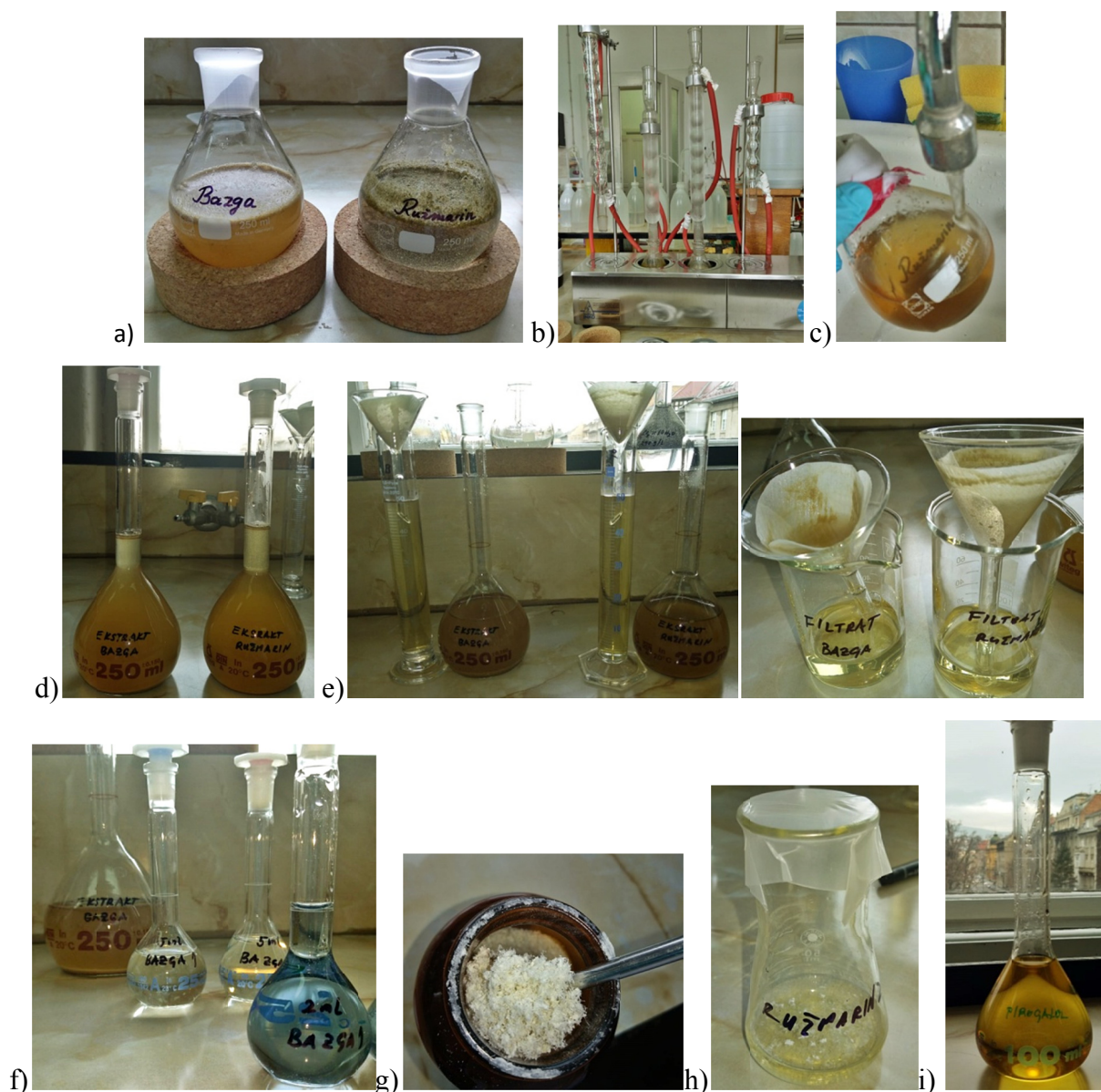
3.5.3. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina

Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima ružmarina i cvjetovima bazge određen je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku opisanom u literaturi. [29] 1,000 g praškasto usitnjenog biljnog materijala pomiješano je u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode (slika 16a) i ekstrahirano zagrijavanjem 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (slika 16b). Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod tekućom vodom (slika 16c), kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, razrijeđen destiliranom vodom do 250,0 mL (slika 16d) te profiltriran (slika 16e). Prvih je 50 mL filtrata bačeno dok se ostatak filtrata uzimao za analizu. 5,0 mL filtrata preneseno se u odmjernu tikvicu od 25,0 ml te se tikvica nadopunila vodom do oznake. Potom je 2,0 mL te otopine pomiješano s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL te je sadržaj nadopunjen otopinom natrijeva karbonata (290 g/L) do oznake (slika 16f). Apsorbancija se mjeri nakon 30 minuta pri 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu. Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (slika 16g) (netaninskih polifenola), u 10,0 mL filtrata dodano je 0,1000 g kožnog praška (slika 16h) i sadržaj tikvice snažno se izmućkivan tijekom 60 minuta na laboratorijskoj tresilici. Nakon filtriranja, 5,0 mL dobivenog filtrata razrijeđeno je vodom do 25,0 mL, potom je 2,0 mL te otopine pomiješano u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode, a sadržaj tikvice je zatim nadopunjen do oznake otopinom natrijeva karbonata (290 g/L). Apsorbancija se mjeri nakon 30 min pri 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu. Standardna otopina pirogalola (slika 16i) pripremljena je otapanjem 50,0 mg pirogalola u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100,0 mL, te je zatim 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno vodom do 100,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25,0 mL, alikvot od 2 mL dobivene otopine pomiješan je s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode te je sadržaj tikvice nadopunjen do oznake otopinom natrijeva karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta, mjeri se apsorbancija pri 760 nm (A_3), uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ trjeslovina} = 62,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je m_1 masa ispitivanog uzorka u gramima, a m_2 masa pirogalola u gramima.

Sva mjerenja rađena su u triplikatu.



Slika 14. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina; a) priprema vodenog ekstrakta u tikvici; b) ekstrahiranje zagrijavanjem na vodenoj kupelji 30 minuta; c) hlađenje ekstrakta pod tekućom vodom; d) razrjeđivanje ekstrakta vodom do oznake; e) filtriranje i bacanje prvih 50 mL filtrata; f) priprema otopina za određivanje ukupnih polifenola g) kožni prašak; h) kožni prašak pomiješan sa 10 mL filtrata; i) otopina pirogalola

3.5.4. Određivanje antocijana

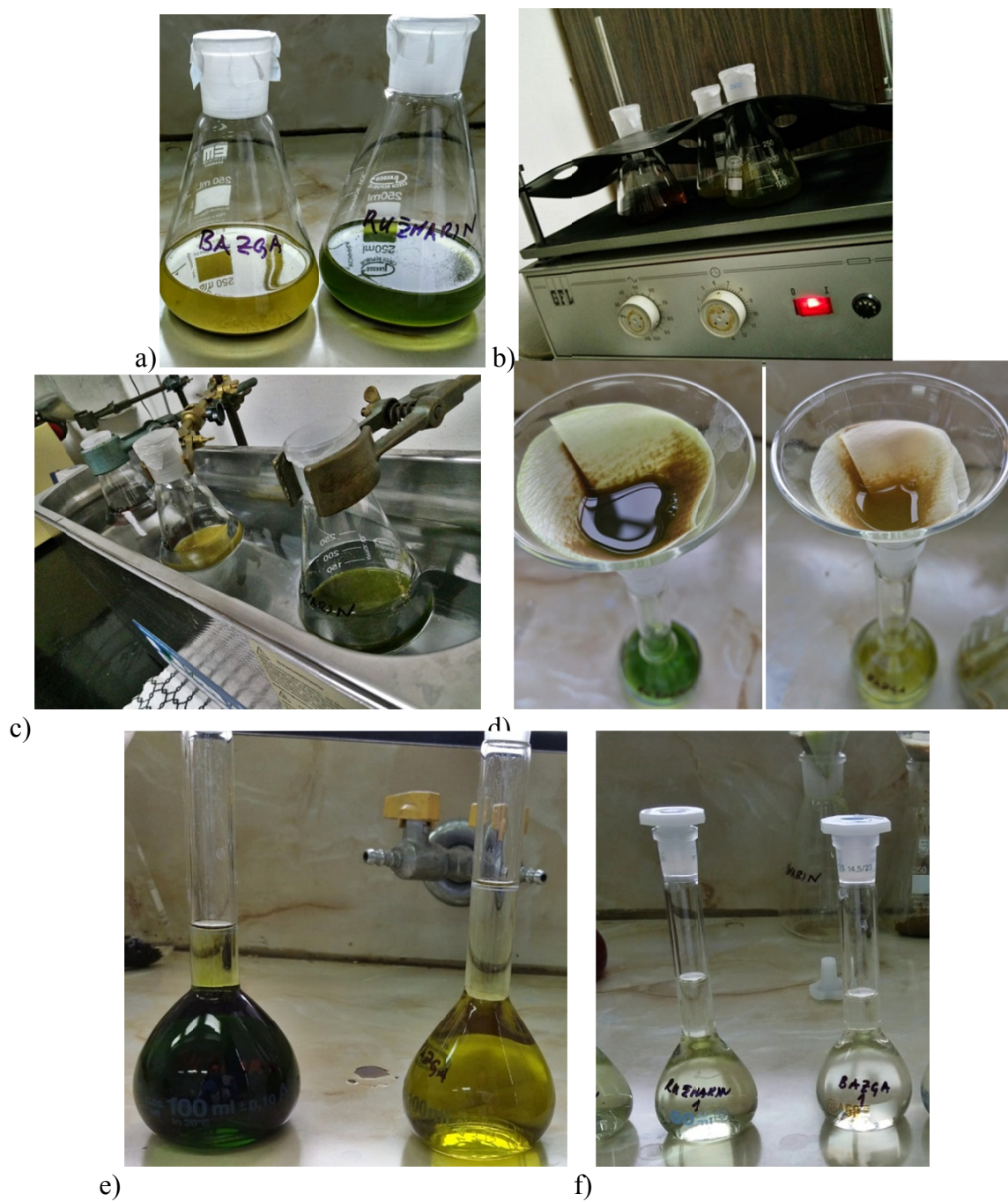
Sadržaj antocijana u listovima ružmarina i cvjetovima bazge određen je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku opisanom u literaturi. [29] 5,000 g praškasto usitnjenog biljnog materijala pomiješano je u Erlenmeyerovoj tikvici s 95 mL metanola (slika 17a) i ekstrahirano mehaničkim izmućkivanjem tijekom 30 minuta na laboratorijskoj tresilici (slika 17b) i 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji (slika 17c). Dobiveni ekstrakt filtriran je u tikvicu od 100 mL (slika 17d), filter-papir je ispran i tikvica nadopunjena metanolom do oznake (slika 17e). Dobivena otopina razrijeđena je 50 puta s 0,1 %-tnom otopinom HCl u metanolu (V/V) (slika 17f). Mjeri se apsorbancija pri 528 nm uz 0,1 %-tni HCl u metanolu kao poredbenu otopinu.

Udio antocijana izračuna se kao cijanid-3-glukozid klorid prema izrazu:

$$\% \text{ antocijana} = \frac{A \times 500}{718 \times m}$$

uzevši u obzir da specifična apsorbancija cijanid-3-glukozid klorida pri 528 nm iznosi 718, gdje je m masa ispitivanog uzorka u gramima, a A ispitivane otopine na 528 nm.

Sva mjerenja rađena su u triplikatu.

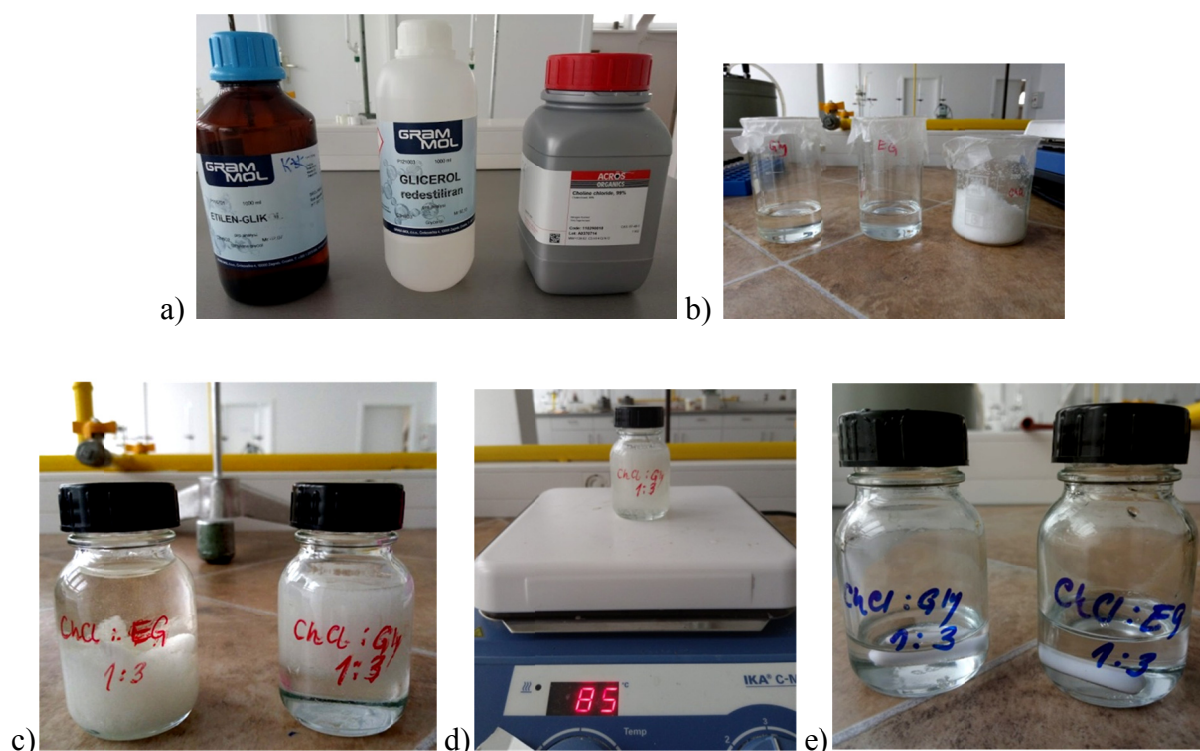


Slika 15. Određivanje antocijana; a) usitnjeni biljni materijal pomiješan s metanolom; b) ekstrakcija mućkanjem na laboratorijskoj tresilici; c) ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji; d) filtriranje ekstrakta ružmarina i bazge; e) nadopunjavanje ekstrakta do oznake metanolom; f) ispitivane otopine spremne za analizu

3.6. Priprava DES-a

Organske komponente od kojih su napravljeni DES-ovi; etilen-glikol (EG), glicerol (Gly) i kolin-klorid (ChCl) (slika 18a) osušene su u vakuumskom sušioniku, pri 60 °C i tijekom 8 h (slika 18b). Potrebna masa komponenti za određeni sastav DES-a izračunala se preko zadanog molarnog omjera. Donori vodikove veze (HBD) pomiješani su s akceptorima vodikovih veza (HBA) u odgovarajućem molarnom omjeru, izvagane su prethodno izračunate mase izravno u staklene bočice s čepom (slika 18c) i miješane na magnetnoj miješalici pri temperaturi oko 80 °C (slika 18d) do nastanka prozirne homogene smjese (otopine) (slika 18e).

Pripravljene su DES-ovi na osnovi kolin-klorida (HBA) uz etilen-glikol (EG) ili glicerol (Gly) kao HBD u molarnom omjeru 1:3. Pripravljene DES-ovi moraju biti pogodne viskoznosti kako bi se mogli lako miješati na magnetnoj miješalici. Broj okretaja na miješalici ovisi o viskoznosti DES-a. U tablici 1 prikazani su pripravljene DES-ovi.



Slika 16. Pripremanje DES-a a) organske komponente za sintezu DES-ova; b) osušene komponente u vakuumskom sušioniku prije vaganja i miješanja; c) izvagane komponente prema molarnom omjeru; d) miješanje na magnetskoj miješalici; e) homogene otopine pripremljenih DES-ova

Tablica 1. Pripravljene DES-ovi

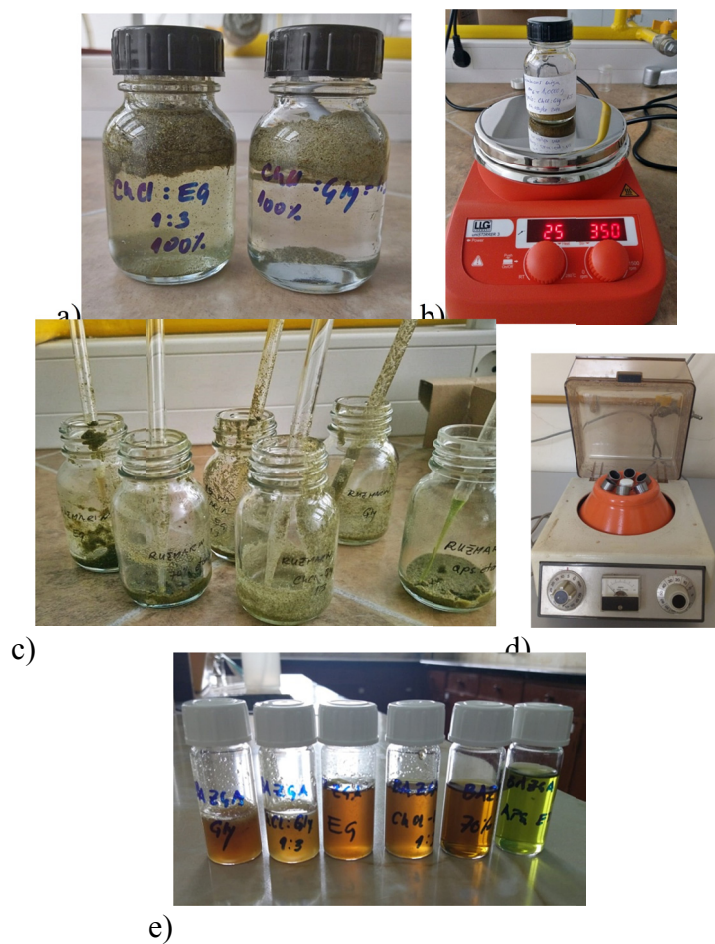
	Molarni omjer	Volumni udio vode
ChCl:EG	1:3	0%
ChCl:EG	1:3	30%
ChCl:EG	1:3	50%
ChCl:Gly	1:3	0%
ChCl:Gly	1:3	30%
ChCl:Gly	1:3	50%

3.7. Ekstrahiranje različitim otapalima

Samljeveni biljni prah cvijeta bazge i lista ružmarina najprije je izvagan na analitičkoj vagi te je 4 g suhe biljne tvari pomiješano u staklenoj bočici s čepom s 40 mL otapala (slika 19a). Tablica 2 prikazuje osam otapala upotrijebljenih za ekstrakciju. Dobivena otopina miješana je na magnetskoj miješalici tijekom 15 min pri temperaturi od 25 °C i 350 rpm (slika 19b). Nakon miješanja dobivene suspenzije kapalicama su prebačene u kivete (slika 19c) i centrifugirane u laboratorijskoj centrifugi (slika 19d). Bistre centrifugirane otopine iznad taloga prebačene su u laboratorijske bočice od 10 mL i čuvane u hladnjaku jer bi pri sobnoj temperaturi moglo doći do rasta mikroorganizama u ekstraktima i njihova onečišćenja (slika 19e).

Tablica 2. Otapala upotrijebljena za ekstrakciju

Otapalo	Volumni udio vode
Destilirana voda	100 %
Etanol	30 %
ChCl:EG = 1:3	0 %
ChCl:EG = 1:3	30 %
ChCl:EG = 1:3	50 %
ChCl:Gly = 1:3	0 %
ChCl:Gly = 1:3	30%
ChCl:Gly = 1:3	50 %



Slika 17. Pripremanje ekstrakta; a) 4 g suhe biljne tvari pomiješano s 40 mL otapala; b) miješanje na magnetskoj miješalici; c) staklene bočice sa zaostalim talogom; d) laboratorijska centrifuga za odijeljivanje; e) pripremljeni ekstrakti spremni za analizu

Za uspoređivanje ekstrakcije fenolnih kiselina iz biljne tvari za različita otapala, kao početna masa uzorka uzeta je masa od 4 g prethodno pripremljenog tekućeg ekstrakta opisanog u gore navedenom tekstu. Dobivene ispitivane otopine jačeg su intenziteta obojenja od otopina koje su dobivene prilikom samog određivanja ukupnih fenolnih kiselina u biljkama. Na slici 20 prikazane su ispitivane otopine i poredbena otopina propisno napravljene od tekućeg ekstrakta s otapalom 70 %-tnim $\text{CHCl}:\text{Gly} = 1.3$. Prilikom vaganja 4 g ekstrakta korištene su male staklene čašice koje su svaki put bile dobro isprane kako bi se sav ekstrakt iz čašice kvantitativno prenio u Erlenmeyerovu tikvicu.

Kod određivanja ukupnog sadržaja fenolnih kiselina s odgovarajućim otapalom korišten je isti propis kao za određivanje ukupnih fenolnih kiselina u suhoj biljnoj tvari. Jedina razlika je što

je početna odvaga, kod uspoređivanja osam otapala, u tekućoj fazi i iznosi 4 g, umjesto 0,200 g (0,300 g) suhe biljne tvari za ukupne fenolne kiseline.



Slika 18. Pripravljene ispitivane otopine i poredbena otopina za 70 % ChCl:Gly = 1:3

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida u određenom otapalu, kao početna masa ekstrakta uzeta je masa od 6 g tekućeg ekstrakta te se koristio isti propis kao za određivanje ukupne količine flavonoida. Jedina razlika je što je korišten tekući ekstrakt mase 6 g, umjesto suhe biljne tvari mase koja je iznosila 0,6 g. Tekući ekstrakt za određivanje flavonoida u 70 %-tnom etanolu prikazan je na slici 21.



Slika 19. Tekući ekstrakt za određivanje flavonoida u etanolu

3.8. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2010 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju određivanja.

4. Rezultati

4.1. TLC karakterizacija polifenolnih sastavnica

S ciljem ispitivanja prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina provedena je kvalitativna analiza odabranih biljaka, *Sambucus nigra* i *Rosmarinus officinalis*, tankoslojnom kromatografijom. Ispitana je prisutnost flavonoidnih glikozida, te klorogenske i ružmarinske kiseline.

Polifenolne sastavnice karakterizirane su prema položaju odijeljenih zona uspoređivanjem s referentnim spojevima flavonoidnih glikozida (kvercetinški glikozidi) i fenolnih kiselina, tj. faktoru zadržavanja (retencijskom faktoru, R_F), boji i intenzitetu obojenja odijeljenih zona.

Na tanki sloj stacionarne faze silikagela Kieselgel 60 F254 nanosene su standardne otopine flavonoida (kvercitrin, izokvercitrin i rutin), fenolnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina), i metanolni ekstrakt bazge i ružmarina uz mobilnu fazu (etil-acetat : mravlja kiselina : ledena octena kiselina : voda u volumnom omjeru 100:11:11:27) te reagens za detekciju (tzv. Naturstoff i 5 %-tna otopina polietilen-glikola 4000, NST/PEG reagens). Prije i nakon prskanja ploče s NST/PEG reagensom kromatogrami su promatrani pod UV-svjetlom pri 254 nm i 365 nm. Dobiveni kromatogrami pod UV-svjetlom prikazani su na slici 22. i slici 23.

Metanolni ekstrakti biljnih pripravaka razdijelili su se tankoslojnom kromatografijom na različite zone. Na kromatogramu pri UV-365 nm uočene su fluorescentne narančaste zone karakteristične za kvercetinške glikozide i svijetloplave kromatografske zone koje pripadaju fenolnim kiselinama. Iz dobivenih kromatograma, pomoću R_F -vrijednosti i boje razvijenih kromatografskih zona može se zaključiti da metanolni ekstrakt bazge sadrži rutin, izokvercitrin i klorogensku kiselinu, dok ružmarin sadrži kvercitrin i još dva kvercetinška glikozida koja se ne nalaze u poredbenoj otopini te ružmarinsku kiselinu.

4.1.1. Kvalitativna analiza biljaka

Nakon prskanja i promatranja kromatograma pri 365 nm kod obje biljne vrste vidljive su zone narančaste fluorescencije u R_F -području od 0,45 do 0,83 (slika 23).

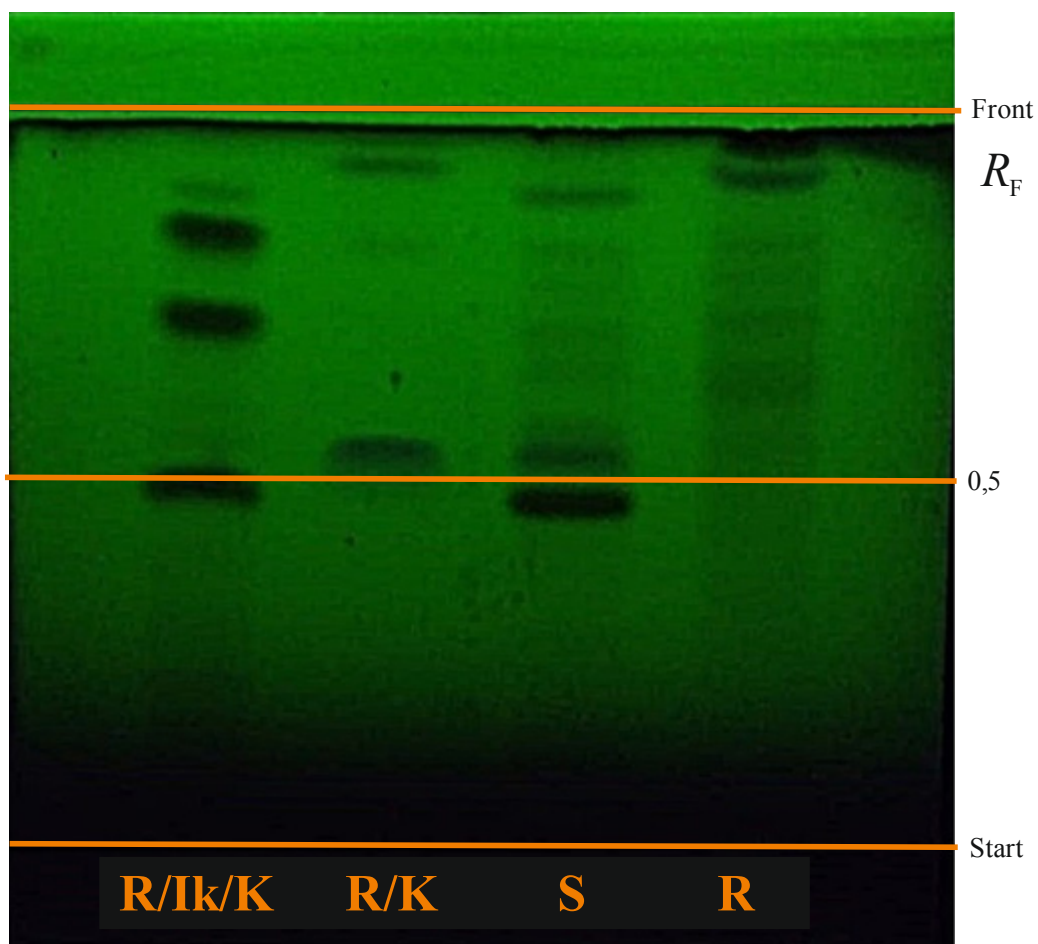
Usporedbom kromatograma metanolnog ekstrakata bazge i poredbenih supstancija dokazana je prisutnost intenzivne narančaste zone ($R_F = 0,45$) koja položajem i bojom odgovara poredbenoj supstanciji rutina. Kod ružmarina nije dokazana prisutnost rutina. Također su iz kromatografskih slika metanolnih ekstrakata bazge i ružmarina i poredbenih supstancija vidljive slabe zone narančaste fluorescencije koja dokazuje prisutnost izokvercitrina kod bazge ($R_F = 0,75$) i kvercitrina kod ružmarina ($R_F = 0,83$).

Na kromatogramu metanolnog ekstrakta ružmarina vidljiva je zona intenzivne narančaste fluorescencije s R_F -vrijednošću 0,51, i slaba zona narančaste fluorescencije s R_F -vrijednošću 0,60 dok kod bazge nisu detektirane. Dobiveni kromatogrami istraživanih biljnih vrsta pokazuju da bazga i ružmarin imaju različit sastav i količinu flavonoida.

Nakon prskanja i promatranja kromatograma pri 365 nm kod obje biljne vrste vidljive su zone fluorescencije svijetloplave boje u R_F -području od 0,52 do 0,90 (slika 23).

Usporedbom kromatograma metanolnog ekstrakata bazge i poredbenih supstancija dokazana je prisutnost intenzivne svijetloplave zone ($R_F = 0,52$) koja položajem i bojom odgovara poredbenoj supstanciji klorogenske kiseline. Kod ružmarina nije dokazana prisutnost klorogenske kiseline.

Na kromatogramu metanolnog ekstrakta ružmarina vidljiva je zona intenzivne svijetloplave fluorescencije s R_F -vrijednošću 0,90 karakteristična za ružmarinsku kiselinu, dok kod bazge nije detektirana. Dobiveni kromatogrami istraživanih biljnih vrsta pokazuju da bazga i ružmarin imaju različit sastav fenolnih kiselina.



Slika 20. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u cvjetovima bazge i listovima ružmarina

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F254 TLC ploča

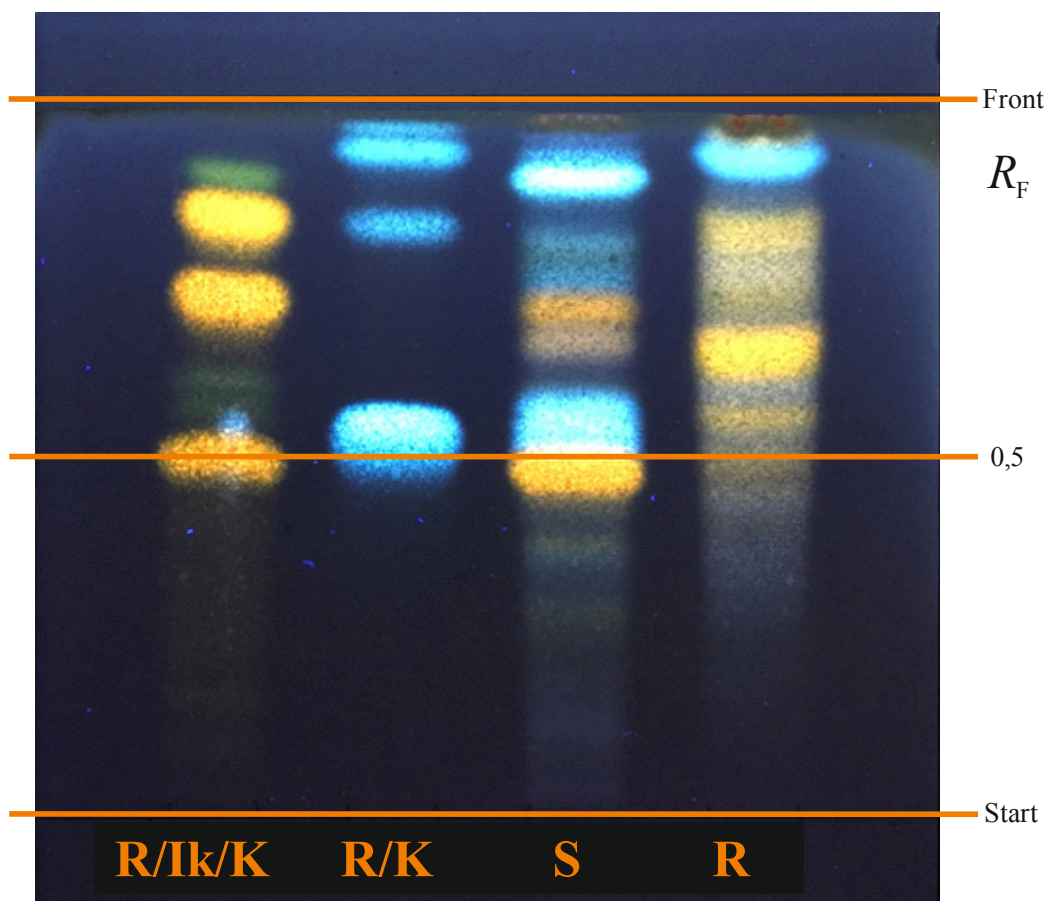
Pokretna faza: etil-acetat : mravlja kiselina : octena kiselina : voda (V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: S – *Sambucus nigra*, R – *Rosmarinus officinalis*

Poredbene supstancije: R – rutin ($R_F = 0,45$), Ik – izokvercitrin ($R_F = 0,75$),

K – kvercitrin ($R_F = 0,83$)



Slika 21. Kromatogram flavonoidnih glikozida u cvjetovima bazge i listovima ružmarina

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F254 TLC ploča

Pokretna faza: etil-acetat : mravlja kiselina : octena kiselina : voda (V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **S** – *Sambucus nigra*, **R** – *Rosmarinus officinalis*

Poredbene supstancije: **R** – rutin ($R_F = 0,45$), **Ik** – izokvercitrin ($R_F = 0,75$),

K – kvercitrin ($R_F = 0,83$)

4.2. Kvantitativna fitokemijska analiza polifenola

Kvantitativna fitokemijska analiza polifenola provedena je odgovarajućom spektrofotometrijskom metodom te je određen sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina i antocijana u listu ružmarina i cvijetu bazge.

4.2.1. Fenolne kiseline u cvijetu bazge

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u cvijetu bazge provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji iz Europske farmakopeje. Određivanje derivata hidroksicimetne kiseline temelji se na stvaranju žuto obojenih kompleksa između *o*-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatnoga reagensa. Žuta boja otopine zaluživanjem prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija se mjeri pri 525 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, izražen kao klorogenska kiselina, izračunava se pomoću specifične apsorbancije koja za klorogensku kiselinu iznosi 188. Iz pripravljenog ekstrakta biljne suhe tvari uzeti su uzorci za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina, a apsorbancija pri 525 nm mjerena je tri puta. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina u cvijetu bazge prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u cvijetu bazge (*Sambucus nigra* L.)

<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
0,201	3,55	3,643 ± 0,1286
0,215	3,79	
0,203	3,59	

masa suhe biljne tvari je 0,300 g

*klorogenska kiselina, 525 nm

4.2.2. Fenolne kiseline u listu ružmarina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u listu ružmarina provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji iz Europske farmakopeje. Određivanje derivata hidroksicimetne kiseline temelji se na stvaranju žuto obojenih kompleksa između *o*-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatnoga reagensa. Žuta boja otopine zaluživanjem prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija se mjeri pri 505 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, izražen kao ružmarinska kiselina, izračunava se pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku

kiselinu iznosi 400. Iz pripravljenog ekstrakta suhe biljne tvari uzeti su uzorci za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina, a apsorbancija pri 505 nm mjerena je tri puta. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina u listu ružmarina prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u listu ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
0,329	4,13	3,963 ± 0,1563
0,314	3,94	
0,304	3,82	

masa suhe biljne tvari je 0,199 g

*ružmarinska kiselina, 505 nm

4.2.3. Flavonoidi u cvijetu bazge i listu ružmarina

Količina ukupnih flavonoida u cvijetu bazge i listu ružmarina određena je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji. S ciljem određivanja sadržaja flavonoida bilo je potrebno provesti hidrolizu flavonoidnih glikozida, nakon čega su nastali aglikoni odijeljeni izmućkivanjem s etil-acetatom. Dodatkom aluminijskoga klorida otopini aglikona nastaju žuto obojeni kompleksni spojevi s maksimumom apsorbancije u vidljivom području pri 425 nm. Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid računa se pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercetrozid iznosi 500. Poredbene otopine bile su pripremljene bez aluminijskoga klorida. Iz pripremljenog ekstrakta cvijeta bazge i lista ružmarina pripremljeni su uzorci za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Apsorbancija pri 425 nm izmjerena je tri puta za obje biljne vrste. Dobiveni rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktu cvijeta bazge i lista ružmarina prikazani su u tablicama 5 i 6.

Tablica 5. Rezultati određivanja flavonoida u cvijetu bazge (*Sambucus nigra* L.)

<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
0,446	0,93	0,923 ± 0,0058
0,443	0,92	
0,440	0,92	

masa suhe biljne tvari je 0,6001 g

*izokvercetrozid, 425 nm

Tablica 6. Rezultati određivanja flavonoida u listu ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
0,136	0,28	0,287 ± 0,0115
0,134	0,28	
0,142	0,30	

masa suhe biljne tvari je 0,6002 g

*izokvercetrozid, 425 nm

4.2.4. Antocijani u cvijetu bazge i listu ružmarina

Kvantitativna analiza antocijana u cvijetu bazge i listu ružmarina provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji. Metoda se zasniva na svojstvu antocijana da u jako kiseljoj sredini (pH = 1) povećavaju apsorbanciju pri valnoj duljini 528 nm. Apsorbancija se mjeri pri 528 nm, a sadržaj ukupnih antocijana, izražen kao cijanid-3-glukozid, izračunava se pomoću specifične apsorbancije koja za cijanid-3-glukozid iznosi 718. Iz pripremljenog ekstrakta suhe biljne tvari uzeti su uzorci za spektrofotometrijsko određivanje antocijana, a apsorbancija pri 528 nm mjerena je tri puta. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja antocijana u cvijetu bazge i listu ružmarina prikazani su u tablicama 7 i 8.

Tablica 7. Rezultati određivanja antocijana u cvijetu bazge (*Sambucus nigra* L.)

<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
0,005	0,00069	0,000647 ± 7,5 × 10 ⁻⁵
0,005	0,00069	
0,004	0,00056	

masa suhe biljne tvari je 5,000 g

*cijanid-3-glukozid, 528 nm

Tablica 8. Rezultati određivanja antocijana u listu ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
0,011	0,00153	0,001483 ± 2,1 × 10 ⁻⁴
0,012	0,00167	
0,009	0,00125	

masa suhe biljne tvari je 5,001 g

*cijanid-3-glukozid, 528 nm

4.2.5. Ukupni polifenoli i trjeslovine

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u cvijetu bazge i listu ružmarina provedena je spektrofotometrijskom metodom. Princip određivanja trjeslovina temelji se na određivanju ukupnih polifenola u ekstraktu suhe biljne tvari prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine. S Folin-Ciocalteuovim reagensom polifenolne sastavnice formiraju plavo obojene kompleksne spojeve, a apsorbancija nastalih plavih otopina mjeri se pri 760 nm. Sadržaj trjeslovina, izražen kao pirogalol, određen je iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak. Mjerenje apsorbancije provedeno je na tri uzorka, uz vodu kao poredbenu otopinu. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina u cvijetu bazge i lista ružmarina prikazani su u tablicama 9 i 10.

Tablica 9. Rezultati određivanja trjeslovina u cvijetu bazge (*Sambucus nigra* L.)

	<i>A</i>	Udio, <i>x</i> (%)	$\bar{x} \pm SD$
ukupni polifenoli	0,310	2,7331	2,7478 ± 0,0134
	0,312	2,7507	
	0,313	2,7595	
polifenoli neadsorbirani na kožni prašak	0,271	2,3892	2,3334 ± 0,0531
	0,264	2,3275	
	0,259	2,2834	
pirogalol	0,357	-	-
	0,341	-	
	0,361	-	
polifenoli adsorbirani na kožni prašak (trjeslovine)	-	0,3438	0,4144 ± 0,0666
	-	0,4232	
	-	0,4761	

masa suhe biljne tvari je 1,0001 g

*pirogalol, 760 nm

masa pirogalola je 0,0498 g, apsorbancija pirogalola je 0,353

Tablica 10. Rezultati određivanja trjeslovina u listu ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

	A	Udio, x (%)	$\bar{x} \pm SD$
ukupni polifenoli	0,456	4,0207	3,9972 ± 0,0222
	0,451	3,9766	
	0,453	3,9942	
polifenoli neadsorbirani na kožni prašak	0,285	2,5129	2,4953 ± 0,0176
	0,281	2,4777	
	0,283	2,4953	
pirogalol	0,357	-	-
	0,341	-	
	0,361	-	
polifenoli adsorbirani na kožni prašak (trjeslovine)	-	1,5078	1,5019 ± 0,0051
	-	1,4989	
	-	1,4989	

masa suhe biljne tvari je 1,0000 g

*pirogalol, 760 nm

masa pirogalola je 0,0498 g, apsorbancija pirogalola je 0,353

U tablicama 11 – 14 uspoređeni su udjeli fenolnih kiselina i flavonoida određenih spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku opisanom u literaturi [29] u tekućim ekstraktima cvijeta bazge i lista ružmarina. Ekstrakti cvijeta bazge i lista ružmarina su pripremljeni s otapalima navedenim u tablici 2.

Tablica 11. Usporedni udjeli fenolnih kiselina u različitim ekstraktima cvijeta bazge

Ekstrakt	Apsorbancija	Udio, x (%)	$\bar{x} \pm SD$
Voda ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,002 \text{ g}$)	0,224	0,297	0,274±0,024
	0,187	0,249	
	0,209	0,277	
70 % EtOH ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,003 \text{ g}$)	0,248	0,328	0,312±0,019
	0,220	0,291	
	0,240	0,318	
100 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,003 \text{ g}$)	0,168	0,222	0,187±0,030
	0,132	0,175	
	0,124	0,165	
70 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,003 \text{ g}$)	0,192	0,254	0,263±0,010
	0,206	0,273	
	0,199	0,263	
50 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,000 \text{ g}$)	0,240	0,318	0,320±0,019
	0,256	0,339	
	0,228	0,302	
100 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,003 \text{ g}$)	0,084	0,111	0,116±0,006
	0,092	0,122	
	0,088	0,116	
70 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,003 \text{ g}$)	0,220	0,291	0,294±0,005
	0,220	0,291	
	0,226	0,299	
50 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,002 \text{ g}$)	0,255	0,338	0,331±0,007
	0,245	0,324	
	0,250	0,331	

Tablica 12. Usporedni udjeli flavonoida u različitim ekstraktima cvijeta bazge

Ekstrakt	Apsorbancija	Udio, x (%)	$\bar{x} \pm SD$
Voda ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,003 \text{ g}$)	0,163	0,0339	0,034±0,0003
	0,164	0,0341	
	0,161	0,0335	
70 % EtOH ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,002 \text{ g}$)	0,326	0,0679	0,068±0,0002
	0,328	0,0683	
	0,327	0,0681	
100 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,193	0,0402	0,039±0,0011
	0,183	0,0381	
	0,190	0,0396	
70 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,000 \text{ g}$)	0,321	0,0669	0,067±0,0001
	0,320	0,0667	
	0,321	0,0669	
50 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,002 \text{ g}$)	0,226	0,0471	0,047±0,0011
	0,221	0,0460	
	0,231	0,0481	
100 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,042	0,0087	0,009±0,0001
	0,041	0,0085	
	0,042	0,0087	
70 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,092	0,0192	0,019±0,0003
	0,090	0,0187	
	0,091	0,0192	
50 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,002 \text{ g}$)	0,188	0,0392	0,039±0,0007
	0,187	0,0389	
	0,190	0,0402	

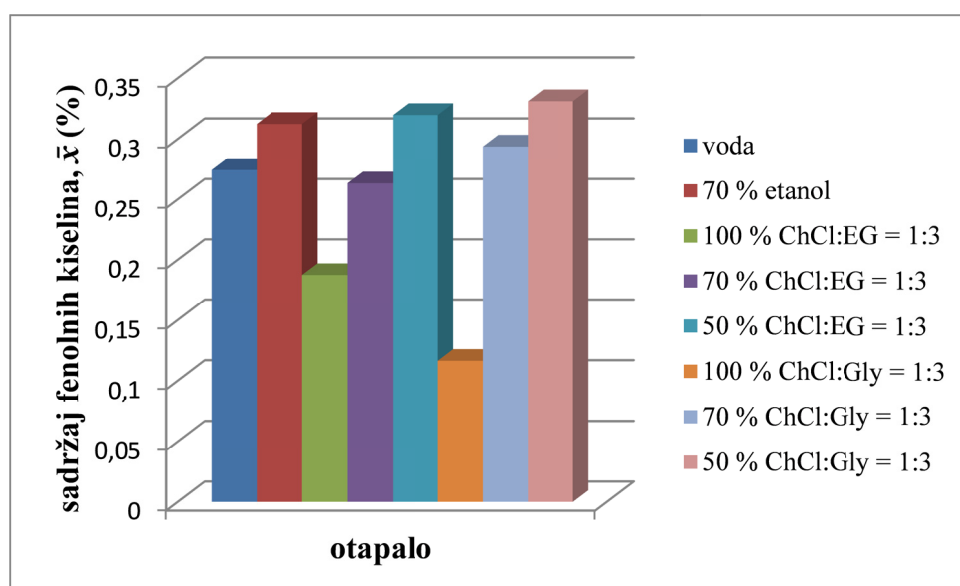
Tablica 13. Usporedni udjeli fenolnih kiselina u različitim ekstraktima lista ružmarina

Ekstrakt	Apsorbancija	Udio, x (%)	$\bar{x} \pm SD$
Voda ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,001 \text{ g}$)	0,527	0,329	0,324±0,006
	0,520	0,325	
	0,508	0,318	
70 % EtOH ($m_{\text{ekstrakta}} = 3,999 \text{ g}$)	0,616	0,385	0,382±0,005
	0,601	0,376	
	0,615	0,384	
100 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,001 \text{ g}$)	0,229	0,143	0,147±0,005
	0,236	0,147	
	0,244	0,152	
70 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,001 \text{ g}$)	0,569	0,356	0,359±0,012
	0,595	0,372	
	0,557	0,348	
50 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,000 \text{ g}$)	0,630	0,394	0,383±0,019
	0,578	0,361	
	0,628	0,393	
100 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,000 \text{ g}$)	0,080	0,050	0,049±0,005
	0,070	0,044	
	0,085	0,053	
70 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,002 \text{ g}$)	0,348	0,217	0,223±0,006
	0,367	0,229	
	0,360	0,224	
50 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 4,000 \text{ g}$)	0,524	0,328	0,322±0,008
	0,521	0,326	
	0,501	0,313	

Tablica 14. Usporedni udjeli flavonoida u različitim ekstraktima lista ružmarina

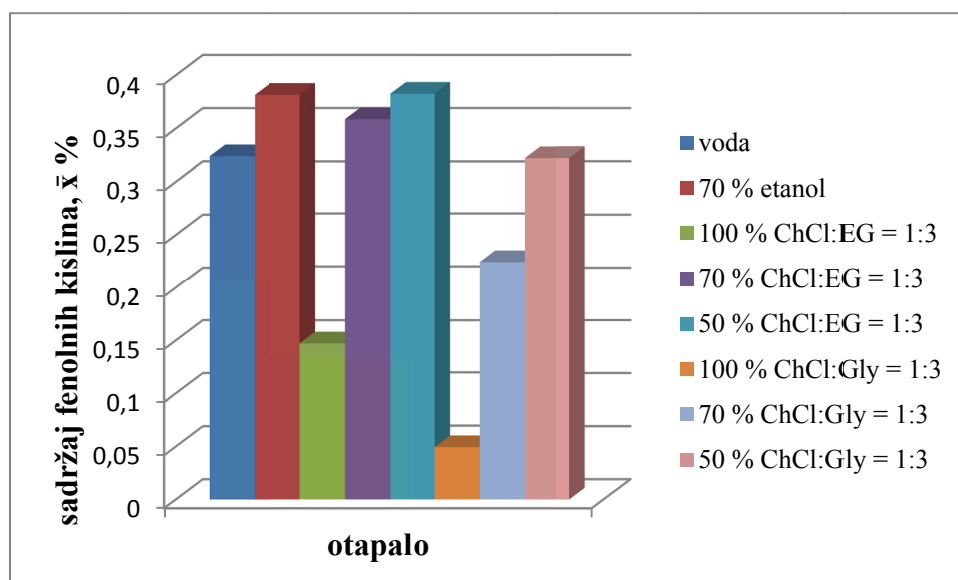
Ekstrakt	Apsorbancija	Udio, x (%)	$\bar{x} \pm SD$
Voda ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,028	0,0058	0,006±0,0001
	0,027	0,0056	
	0,027	0,0056	
70 % EtOH ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,002 \text{ g}$)	0,066	0,0137	0,014±0,0006
	0,068	0,0142	
	0,063	0,0131	
100 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,015	0,0031	0,003±0,0003
	0,017	0,0035	
	0,014	0,0029	
70 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,000 \text{ g}$)	0,027	0,0056	0,006±0,0003
	0,026	0,0054	
	0,029	0,0060	
50 % ChCl:EG = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,027	0,0056	0,005±0,0002
	0,027	0,0052	
	0,026	0,0054	
100 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,001 \text{ g}$)	0,007	0,0015	0,002±0,0007
	0,014	0,0029	
	0,009	0,0019	
70 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,004 \text{ g}$)	0,008	0,0017	0,002±0,0008
	0,015	0,0031	
	0,009	0,0019	
50 % ChCl:Gly = 1:3 ($m_{\text{ekstrakta}} = 6,002 \text{ g}$)	0,030	0,0062	0,006±0,0007
	0,031	0,0065	
	0,025	0,0052	

Slika 24. grafički prikaz je prikaz tablice 11. Na slici je uspoređen sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u različitim ekstraktima cvijeta bazge. Kod cvijeta bazge uočava se da ekstrakt s otapalom 50 %-tnim ChCl:Gly = 1:3 ima najviši udio fenolnih kiselina. Slijede ga ekstrakti s otapalima 50 %-tnim ChCl:EG = 1:3 te 70 %-tni etanol. Također se lako primjećuje postupno povećanje udjela fenolnih kiselina u ekstraktima bazgina cvijeta kako raste udio vode kod oba niskotemperaturna eutektička otapala. Voda kao ekstrakcijsko sredstvo daje sličan sadržaj fenolnih kiselina kao niskotemperaturna eutektička otapala s volumnim udjelom vode od 30 % (70 %-tni ChCl:EG = 1:3 i 70 %-tni ChCl:Gly = 1:3). Čisti DES-ovi, bez dodatka vode, pokazuju najmanje ekstrahiranih fenolnih kiselina iz cvijeta bazge.



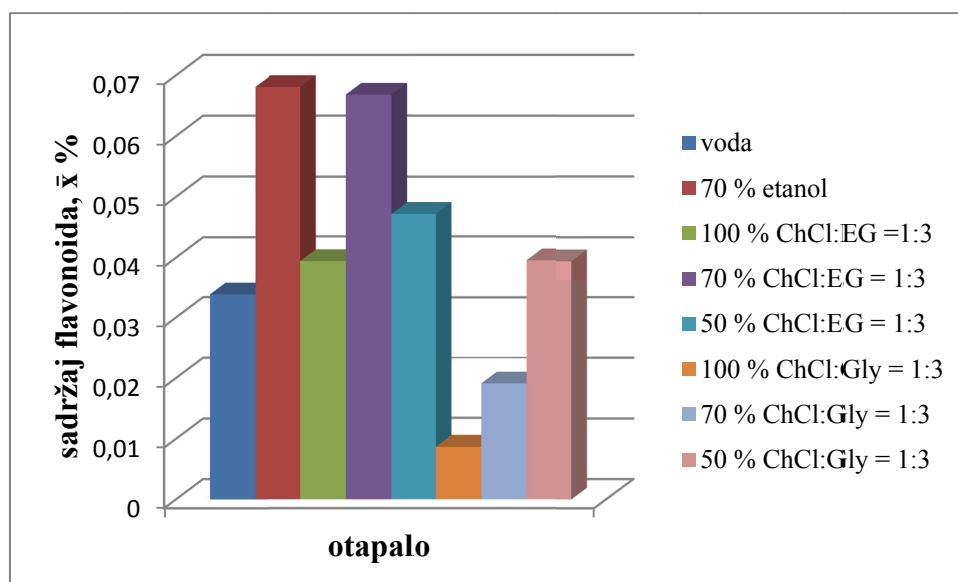
Slika 22. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima cvijeta bazge

Slika 25. grafički prikaz je prikaz tablice 13. Na slici je uspoređen sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u različitim ekstraktima lista ružmarina. Kod lista ružmarina uočava se da ekstrakti s otapalima 50 % ChCl: EG = 1:3 i 70 %-tni etanol imaju najviši udio fenolnih kiselina. Slijede ga ekstrakti s otapalima 70 % ChCl:EG = 1:3 te 50 % ChCl:Gly = 1:3. Također se, kao i kod bazge, primjećuje postupno povećanje udjela fenolnih kiselina u ekstraktima listova ružmarina kako raste udio vode kod oba DES-a. Čista voda daje ekstrakt s nešto manjim udjelom fenolnih kiselina od 70 % ChCl:EG = 1:3 Čisti DES-ovi, bez dodatka vode, najslabije ekstrahiraju fenolne kiselina iz lista ružmarina. Kao i kod bazge, čisti ChCl:Gly = 1:3 ima najmanji udio fenolnih kiselina te se pokazuje kao najlošije otapalo za fenolne kiseline.



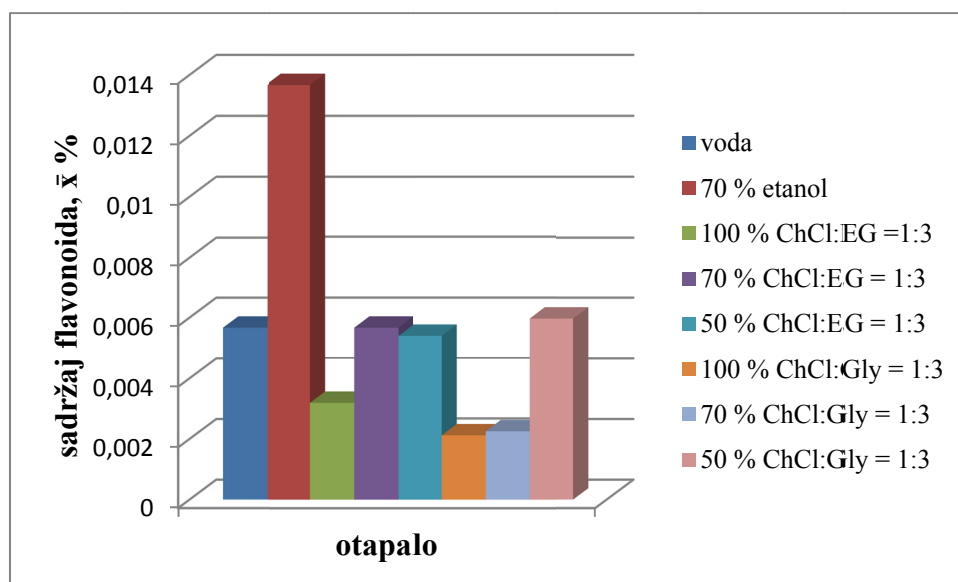
Slika 23. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima lista ružmarina

Slika 26. grafički prikaz je prikaz tablice 12. Na slici je uspoređen sadržaj ukupnih flavonoida u različitim ekstraktima cvijeta bazge. Na grafu se vidi da ekstrakti sa 70 %-tnim etanolom i 70 %-tnim ChCl:EG = 1:3 imaju najviši udio flavonoida. Slijedi ih ekstrakt s 50 % ChCl:EG = 1:3. Čisti DES ChCl:Gly = 1:3, bez dodatka vode pokazuje najmanji sadržaj ekstrahiranih flavonoida iz cvijeta bazge.



Slika 24. Sadržaj flavonoida u ekstraktima cvijeta bazge

Slika 27. grafički prikaz je prikaz tablice 14. Na slici je uspoređen sadržaj ukupnih flavonoida u različitim ekstraktima lista ružmarina. Na grafu se vidi da ekstrakt sa 70 %-tnim etanolom ima najviši udio flavonoida. Ostala otapala pokazuju se kao jako loša otapala za ekstrakciju flavonoida iz ružmarina. Čisti DES ChCl:Gly = 1:3, bez dodatka vode pokazuje najmanji sadržaj ekstrahiranih flavonoida iz lista ružmarina.



Slika 25. Sadržaj flavonoida u ekstraktima lista ružmarina

5. Zaključak

U okviru ovog diplomskog rada provedeno je istraživanje ekstrakcije polifenolnih spojeva iz suhoga cvijeta bazge i lista ružmarina pomoću osam različitih otapala. Cilj je bio pronaći zeleno otapalo koje bi zamijenilo štetna konvencionalna otapala često korištena u današnjoj industriji.

Prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima usitnjenog lista ružmarina i svijeta bazge dokazana je tankoslojnom kromatografijom.

Primjenom spektrofotometrijskih metoda utvrđeno je da suhi cvjetovi bazge sadrže 3,64 % fenolnih kiselina, izraženo kao klorogenska kiselina i mjereno pri 525 nm, 0,92 % flavonoida izraženo kao izokvercetrozid pri 425 nm, $6,47 \times 10^{-4}$ % antocijana izraženo kao cijanid-3-glukozid pri 528 nm te 0,41 % trjeslovina izraženo kao pirogalol i mjereno pri 760 nm. Suhi listovi ružmarina sadrže 3,96 % fenolnih kiselina, izraženo kao ružmarinska kiselina pri 505 nm, 0,28 % flavonoida izraženo kao izokvercetrozid pri 425 nm, $1,48 \times 10^{-3}$ % antocijana izraženo kao cijanid-3-glukozid pri 528 nm te 1,50 % trjeslovina izraženo kao pirogalol i mjereno pri 760 nm.

Rezultati istraživanja provedenih u okviru ovog diplomskog rada pokazuju da trokomponentna otapala 50 % ChCl:EG = 1:3 i 50 % ChCl:Gly = 1:3 imaju skoro istu ekstrakcijsku djelotvornost prilikom ekstrahiranja fenolnih kiselina kao 70 %-tni etanol. DES 50 % ChCl:EG = 1:3 pokazuje nešto više vrijednosti za ekstrakciju fenolnih kiselina iz lista ružmarina, dok su kod cvjetova bazge postignuti bolji rezultati s DES-om 50 % ChCl:Gly = 1:3. Za flavonoide se nijedno pripravljeno otapalo nije pokazalo ni približno tako dobro kao 70 %-tni etanol te se istraženi DES-ovi ne mogu preporučiti za ekstrakciju flavonoida.

Dobiveni rezultati pružaju nove znanstvene spoznaje za daljnja istraživanja različitih DES-ova za ekstrakciju ljekovitih biljnih sastavnica kako bi se u što većem udjelu zamijenila hlapljiva organska i konvencionalna otapala i smanjila potrošnja energije prilikom razdvajanja takvih otapala od ekstrahiranih komponenti.

6. Popis simbola

ChCl – kolin-klorid (*engl.* choline chloride)

ChCl:EG = 1:3 – kolin-klorid i etilen-glikol u molarnom omjeru 1:3

ChCl:Gly = 1:3 – kolin-klorid i glicerol u molarnom omjeru 1:3

DES – niskotemperaturno eutektičko otapalo (*engl.* deep eutetic solvent)

EG – etilen-glikol (*engl.* ethylene glycol)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration)

Gly – glicerol (*engl.* glycerol)

HBD – donor protona (*engl.* hydrogen bond donor)

HBA – akceptor protona (*engl.* hydrogen bond acceptor)

IL – ionska kapljevina (*engl.* ionic liquid)

NST/PEG – reagens Naturstoff i 5 %-tna otopina polietilen-glikola 4000

PET – polietilen-tereftalat

SCF – nadkritični fluid (*engl.* supercritical fluid)

7. Popis literature

1. Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Vorkapić-Furač, J., Gaurina Srček, V., Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene, *Kem. Ind.*, **63** (2014) 163-171.
2. Zhuang, B., Dou, L.-L., Li, P., Liu, E. H., Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **134** (2017) 214-219.
3. Li, C., Li, D., Zou, S., Li, Z., Yin, J., Wang, A., Cui, Y., Yao, Z., Zhao, Q., Extraction desulfurization process of fuels with ammonium-based deep eutectic solvents, *Green Chem.*, **15** (2013) 2793-2799.
4. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M., *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2. izd., Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, UK, 2012.
5. Yang, M., Cao, J., Cao, F., Lu, C., Su, E., Efficient extraction of bioactive flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves using deep eutectic solvent/water mixture as green media, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **32** (2018) 315-324.
6. Anastas, P. T., Eghbali, N., *Green chemistry: Principles and practice*, *Chem. Soc. Rev.*, **39** (2010) 301-312.
7. Miller, R. K., Peters, P., McElhatton, P. R., *Drugs During Pregnancy and Lactation, Occupational, Industrial, and Environmental Agents*, Academic Press Elsevier, London, UK, 2007., str. 561-598.
8. Kareem, M. A., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., Hadj-Kali, M. K. O., Bagh, F. S. G., Alnashef, I. M., Phase equilibria of toluene/heptane with deep eutectic solvents based on ethyltriphenylphosphonium iodide for the potential use in the separation of aromatics from naphtha, *J. Chem. Thermodyn.*, **65** (2013) 138-149.
9. PubChem, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol> (pristup 4. lipnja 2019.)
10. Uhlik, B., *Požarno opasne, toksične i reaktivne tvari, HDKI/Kemija u industriji*, Zagreb, 1993., str. A49-A52
11. Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Yoo, D. E., Han, S. Y., Lee, J., Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products, *J. Clean Prod.*, **151** (2017) 87-95.
12. European Food Safety Authority (EFSA), <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2353> (pristup 3. lipnja, 2019.)

13. United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Marketing Service (AMS), <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Choline%20TR.pdf> (pristup 4. lipnja, 2019.)
14. Uhlik, B., Požarno opasne, toksične i reaktivne tvari, HDKI/Kemija u industriji, Zagreb, 2000., str. A393-A396
15. Todorovic, B., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Ivancic, A., Phenolic compounds in floral infusions of various *Sambucus* species and their interspecific hybrids, Turk. J. Agric. For., **41** (2017) 154-164.
16. Kaack K., Austed, T., Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. Plant. Food. Hum. Nutr., **52** (1998) 187-198.
17. Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., Carvalho, J. C. T., *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved, J. Ethnopharmacol., **229** (2019) 29-45.
18. Robbins, R. J., Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, J. Agric. Food Chem., **51** (2003) 2866-2887.
19. Ivanović, M., Alañón, M. E., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by tailor-made natural deep eutectic solvents, Food. Res. Int., **111** (2018) 67-76.
20. Ozturk, B., Parkinson, C., Gonzalez-Miquel, M., Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents, Sep. Purif. Technol., **206** (2018) 1-13.
21. Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K. H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, Phytochemistry, **70** (2009) 1663-1679.
22. Gamaro, G. D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P., Ardenghi, P., Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats, ISRN Pharmacol., **2011** (2011) 451682.
23. Izawa, K., Amino, Y., Kuroda, M., Human–Environment Interactions – Taste, u Liu, H. W., Mander, L. (ur.), Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology 4, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2010., str. 631-671.
24. Wang, T., Li, Q., Bi, K., Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate, Asian J. Pharm. Sci., **13** (2018) 12-13.
25. Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R., Flavonoids: an overview, J. Nutr. Sci., **5** (2016) 1-15.
26. Laleh, G. H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameel, R., Zare, S., The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four *Berberis* Species, Pak. J. Nutr., **5** (2006) 90-92.

27. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim, S. M., Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food Nutr. Res.*, **61** (2017) 1361779.
28. Wagner H., *Pharmazentische Biologie, Drogen un ihre Inhaltsstoffe*, Gustav Fischer, Stuttgart, Njemačka, 1993.
29. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), *European Pharmacopoeia*, Strasbourg: Council of Europe, 2018., str. 288., 1258., 1276., 1343-1344., 1499-1500.

8. Prilozi

Reagensi za određivanje fenolnih kiselina

- 50 %-tni etanol (pripremiti razrjeđivanjem 96 %-tnog etanola koristeći volumne postotke i pravilo zvijezde)
- 0,5 M HCl (titrival)
- nitrit-molibdat (otopiti 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode)
- 8,5 %-tna otopina NaOH (otopiti 8,5 g NaOH u 100 mL H₂O)

Reagensi za određivanje flavonoida

- 5 g/L otopina heksametilentetramina (otopiti 5 g u 1000 mL H₂O) kloridna kiselina (250 g/L) (razrijediti 70 g koncentrirane HCl vodom do 100,0 mL; $\rho = 1,19$ g/mL što znači da treba 58,8 mL konc. HCl razrijediti vodom do 100,0 mL)
- AlCl₃ (otopiti 2,0 g AlCl₃×6H₂O u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline)
- 5 %-tna metanolna otopina octene kiseline (razrijediti 5,0 mL octene kiseline metanolom do 100,0 mL)

Reagensi za određivanje trjeslovina

- otopina Na₂CO₃×10H₂O (otopiti 29 g u 100 mL H₂O)

Reagensi za određivanje antocijana

- 0,1% otopina HCl u metanolu (V/V) (razrijediti 0,1 mL konc HCl metanolom do 100 mL)

Životopis

Marijana Perković [REDACTED] Osnovnu školu Gradec pohađala je u Gradecu kod Vrbovca. Završila je Medicinsku školu Bjelovar, smjer Farmaceutski tehničar. Godine 2011. dobila je nagradu Fonda Boža Tvrtković. Sudjelovala je u projektima *E-medica* koji su se održali u Dugoj Uvali. Stručnu praksu za srednju školu odradila je u Ljekarni Coner u Bjelovaru. Nakon završene srednje škole, godine 2013. upisala je preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom školovanja radila je preko student-servisa. Stručnu praksu odradila je tijekom treće godine studija u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić u Službi kemijsko-fizikalnih i toksikoloških vještačenja u Zagrebu pod vodstvom Stjepana Brzice, dipl. ing. U studenome 2016. sudjelovala je na 25. forumu Hrvatskog energetskog društva pod nazivom Dan energije u Hrvatskoj.

Završni rad pod naslovom „Utjecaj parametara pripreme na fizikalno-kemijske i katalitičke značajke monolitnog Al/Al₂O₃ – MnCu katalizatora“ pod vodstvom prof. dr. sc. Vesne Tomašić obranila je 21. rujna 2017.

Koautor je rada:

- Zagajski Kučan, K., Perković, M., Cmrk, K., Načinović, D., Rogošić, M., Betaine + (glycerol or ethylene glycol or propylene glycol) deep eutectic solvents for extractive purification of gasoline, *ChemistrySelect*, **3** (2018) 12582-12590.

Na XII. susretu mladih kemijskih inženjera održanom 22. i 23. veljače 2018. sudjelovala je kao koautor s priopćenjem:

- Cmrk, K., Načinović, D., Perković, M., Rogošić, M., Zagajski Kučan, K., Niskotemperaturna eutektička otapala na osnovi betaina za ekstrakcijsku denitrifikaciju i desulfurizaciju goriva., *Knjiga sažetaka, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb, 2018.*, str. 62-62.