

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz kamilice niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Bošnjak, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:149:096808>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Bošnjak

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Bošnjak

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz kamilice niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Marko Rogošić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Marko Rogošić

Dr. sc. Kristina Zagajski Kučan

Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, studeni 2023.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz kamilice niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Sažetak

Niskotemperaturna eutektička otapala pokazala su se potencijalno dobrim sredstvima za ekstrakciju bioaktivnih komponenti, primjerice polifenola, iz cvijeta, ploda, lista i drugih biljnih dijelova. Pregledom literature ustanovljeno je da je kamilica kao vrlo vrijedna sirovina u tom pogledu dosad razmjerno neistražena.

U sklopu ovog diplomskog rada provedene su ekstrakcije polifenolnih spojeva iz suhih usitnjenih cvjetova kamilice pomoću etanola kao konvencionalnog otapala te niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES, engl. *deep eutecic solvent*) kao zelenih otapala. Upotrebljavali su se DES-ovi na bazi kolin-klorida (ChCl) i etilen-glikola (EG) te betaina (B) i propilen-glikola (PG) u različitim molarnim omjerima. Sadržaj bioaktivnih komponenti određen je farmakopejskim postupkom te UV/VIS spektrofotometrijom. Također su određivani ekstrakcijski kapaciteti DES-ova procesom višestupanjske ekstrakcije. Osim toga, masena koncentracija apigenin-7-*O*-glukozida, derivata flavona, u ekstraktima određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Na temelju eksperimentalnih podataka o ekstrakciji fenolnih kiselina najboljim se pokazao DES ChCl:EG molarnoga omjera 1:5 i to u ekstraktu sa najvećim omjerom suhe tvari i otapala. U slučaju određivanja flavonoida najboljim se pokazao DES B:PG molarnoga omjera 1:5 i to također u ekstraktu s najvećim omjerom suhe tvari i otapala. Kod ekstrakcije treslovina uočene su velike oscilacije rezultata, no kao najbolja otapala za ekstrakciju treslovina primjetno se izdvajaju DES-ovi B:PG molarnoga omjera 1:5 i ChCl:EG molarnoga omjera 1:5. Većina ispitanih DES-ova bolja su ekstrakcijska sredstva nego etanol.

Pri ispitivanju ekstrakcijskog kapaciteta uočeno je smanjenje sadržaja bioaktivnih komponenti u ekstraktima s povećanjem broja ekstrakcijskih stupnjeva, suprotno od očekivanoga povećanja.

Rezultati kromatografskog određivanja apigenin-7-*O*-glukozida pokazali su da je DES ChCl:EG bolje ekstrakcijsko sredstvo od DES-a B:PG, nasuprot ekstrakciji ukupnih flavonoida. Općenito su bolji rezultati dobiveni s povećanjem udjela HBD-a i omjera suhe tvari i otapala.

Ključne riječi: Niskotemperaturna eutektička otapala, kamilica, fenolne kiseline, flavonoidi, treslovine, apigenin-7-*O*-glukozid, etanol

Extraction of bioactive components from chamomile by deep eutectic solvents

Abstract

Deep eutectic solvents were found to be potentially good media for extracting bioactive components, for example polyphenols, from flowers, fruits, leaves and other plant parts. A review of the literature has shown that chamomile, as a very valuable raw material, has been relatively unexplored in this regard.

As part of this thesis, the extraction of polyphenolic compounds from dry ground chamomile flowers was carried out using ethanol as a conventional solvent and deep eutectic solvents (DES) as green solvents. DESs based on choline chloride (ChCl) and ethylene glycol (EG) and betaine (B) and propylene glycol (PG) in different molar ratios were used. The content of bioactive components was determined by the pharmacopoeial procedure and UV/VIS spectrophotometry. The extraction capacities of DESs were also determined by the process of multi-stage extraction. In addition, the mass concentration of apigenin-7-*O*-glucoside, a flavone derivative, in the extracts was determined using high-performance liquid chromatography.

Based on the experimental data on the extraction of phenolic acids, DES ChCl:EG with molar ratio 1:5 proved to be the best, in particular in the extract with the highest ratio of dry matter to solvent. In the case of flavonoids, DES B:PG with molar fraction 1:5 proved to be the best, also in the extract with the highest ratio of dry matter to solvent. Large oscillations of results were observed in the extraction of tannins, but DESs B:PG with molar fraction 1:5 and ChCl:EG with molar fraction 1:5 stand out as the best solvents for tannin extraction. Most of the investigated DESs were found to be better extraction media than ethanol.

By examining the extraction capacity, a decrease in the content of bioactive components in the extracts was observed with an increase in the number of extraction stages, contrary to the expected increase.

Chromatographic determination of apigenin-7-*O*-glucoside in the extracts pointed to DES ChCl:EG as a better extraction agent compared to DES B:PG, contrary to the extraction of total flavonoids. In general, better results were obtained with increasing HBD content and dry matter to solvent ratio.

Keywords: Deep eutectic solvents, chamomile, phenolic acids, flavonoids, tannins, apigenin-7-*O*-glucoside, ethanol

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Organska otapala	2
2.1.1. Etanol	2
2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala	3
2.2.1. Kolin-klorid	4
2.2.2. Betain	4
2.2.3. Etilen-glikol	5
2.2.4. Propilen-glikol	5
2.3. Kamilica	6
2.3.1. Fenolne kiseline	7
2.3.2. Flavonoidi	7
2.3.3. Treslovine.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. Kemikalije i reagensi.....	9
3.2. Instrumenti i pribor	10
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola prema europskoj farmakopeji.....	10
3.3.1. Određivanje fenolnih kiselina	10
3.3.2. Određivanje flavonoida	11
3.3.3. Određivanje treslovina	12
3.4. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz kamilice niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	12
3.5. Određivanje ekstrakcijskog kapaciteta DES-ova.....	13
3.6. Određivanje koncentracije apigenin-7- <i>O</i> -glukozida	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Određivanje sadržaja bioaktivnih komponenti ekstrakcijom DES-ovima i etanolom	16
4.2. Određivanje ekstrakcijskog kapaciteta DES-ova.....	22
4.3. Određivanje koncentracije apigenin-7- <i>O</i> -glukozida	24
5. ZAKLJUČAK	29
6. POPIS OZNAKA	31
7. LITERATURA	32

1. UVOD

Kamilica je biljka koja se često upotrebljava u medicini i kozmetici zbog svojih ljekovitih svojstava. U ekstraktima cvijeta kamilice nalaze se brojni bioaktivni spojevi, poput fenolnih kiselina, flavonoida, treslovina i drugih.

Konvencionalni procesi ekstrakcije zahtjevni su, dugotrajni, uključuju velike količine otapala, a mogu dovesti do degradacije ciljanih molekula i djelomičnog gubitka hlapljivih tvari. Unatoč visokoj potrošnji energije i velikoj količini otapala, iskorištenje je često veoma nisko.¹ Procjenjuje se da hlapljiva organska otapala čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija te 30 % svih emisija hlapljivih organskih spojeva u svijetu, uzrokujući brojne negativne učinke na okoliš poput promjene klime, onečišćenja zraka, narušavanja ozonskog omotača, narušavanja ljudskog zdravlja i sl. Osim toga, većina tradicionalno upotrebljenih organskih otapala je toksična, zapaljiva i korozivna.²

U posljednje se vrijeme razmatraju sigurnije i učinkovitije ekstrakcijske tehnologije koje imaju za cilj očuvanje okoliša i smanjenje mogućih negativnih učinaka na ljudsko zdravlje. Zelene tehnologije ekstrakcije smanjuju upotrebu organskih otapala nudeći nova ekološki prihvatljiva, zelena otapala kao što su niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *deep eutectic solvents*, DESs). DES-ovi kao novi razred otapala sastoje se od dviju ili više komponenti koje se ponašaju kao donori i akceptori vodikovih veza. Dvije tvari nemješljive u čvrstoj fazi uobičajeno tvore eutektičku smjesu s nižom točkom taljenja od pojedinačnih komponenti, a vodikove veze dodatno snižavaju talište. DES-ovi se lako pripremaju, visoke su čistoće i niske cijene, nezapaljivi su, netoksični, sigurni, jeftini te lako dostupni.¹ Zbog jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava te mogućnosti dizajniranja za specifične namjene potencijalna su prekretnica u kemijskoj i procesnoj tehnologiji te biotehnologiji. Primjenom tih spojeva omogućuje se poboljšanje postojećih i uspostavljanje novih visokoučinkovitih procesa sigurnijih za ljude i okoliš.³

U radu će se provesti ekstrakcija bioaktivnih komponenti, točnije fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina iz cvijeta kamilice, *Matricaria recutita*, pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Sadržaj bioaktivnih komponenti odredit će se UV/VIS spektrofotometrijom. Osim navedenoga provest će se određivanje koncentracija apigenin-7-O-glukozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC).

2. OPĆI DIO

2.1. Organska otapala

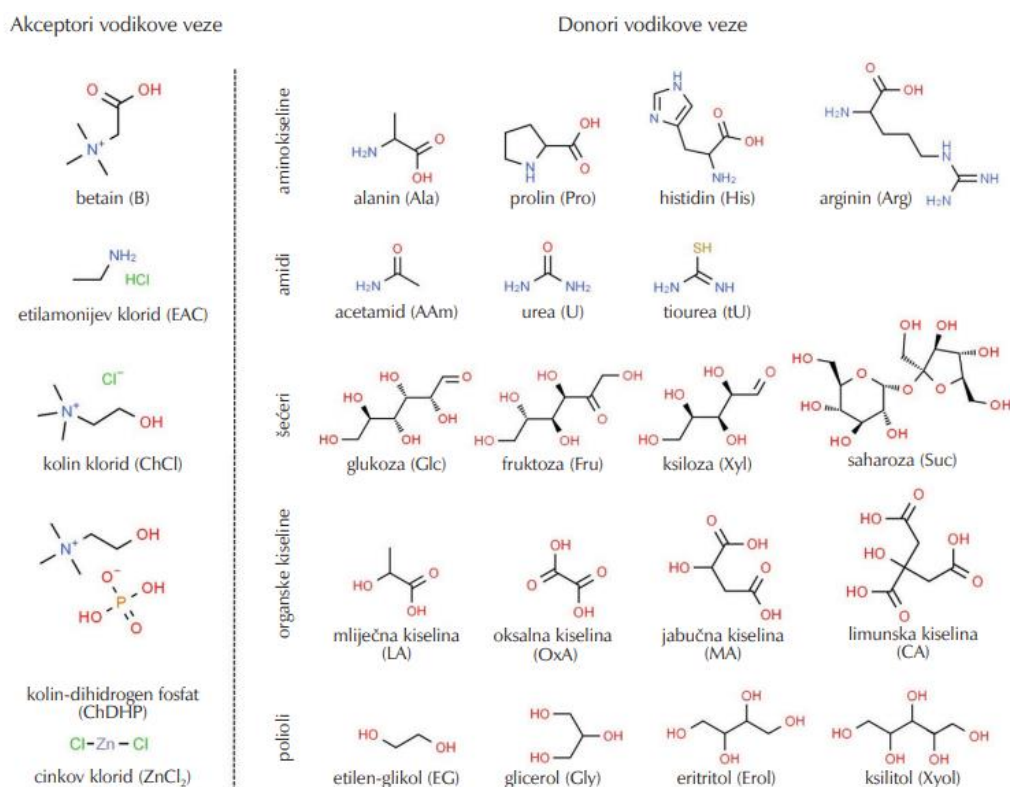
Pod organskim otapalima podrazumijevaju se sve organske tvari i spojevi u kojima se može nešto otopiti. Organske tvari su tvari na bazi ugljika, tj. one tvari koje sadrže ugljik u svojoj molekularnoj strukturi. Neka karakteristična, najčešće korištena organska otapala su etanol, kloroform, metanol, benzen, aceton itd.⁴ Primjenjuju se u proizvodnji boja, lakova, ljepila, odmašćivača i sredstava za čišćenje te u proizvodnji polimera, plastike, tekstila, tiskarskih boja, poljoprivrednih proizvoda i lijekova. Njihova upotreba u industriji je golema, što nažalost dovodi do značajnog narušavanja ljudskog zdravlja kao i onečišćenja okoliša.⁵

2.1.1. Etanol

Etanol je prozirna, bezbojna i zapaljiva kapljevina. Nalazi se u alkoholnim pićima u odgovarajućim koncentracijama, a također se upotrebljava kao kemikalija u sintetskoj organskoj kemiji i kromatografiji. Često se primjenjuje u industrijskim i znanstvenim laboratorijima kao organsko otapalo. Ostale primjene uključuju proizvodnju farmaceutika, dezinfekcijskih sredstava te parfema.⁶ Molekulska formula mu je C_2H_6O ili CH_3CH_2OH , gustoća pri 25 °C iznosi $0,789 \text{ g/cm}^3$, atmosfersko vrelište mu je 78,2 °C, a CAS-broj je 64-17-5.

2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala su „zelena“ otapala nastala miješanjem dviju ili više komponenti koje mogu biti u krutom ili kapljevitom stanju uz formiranje vodikovih veza između njih. Jedna od komponenti ima ulogu akceptora vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA), a druga ulogu donora vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD). Abbott i suradnici pokazali su da smjese supstituiranih kvarternih amonijevih soli, poput kolin-klorida s nekim tvarima tvore eutektičke smjese čije je talište niže od sobne temperature. Shodno tome, postoji područje sastava u blizini eutektika kod kojeg su smjese pri sobnoj temperaturi kapljevite te mogu poslužiti kao odlična otapala. Talište DES-a niže je od tališta koje bi ista smjesa imala da se radi o idealnoj otopini, što je uzrokovano delokalizacijom naboja uslijed stvaranja vodikove veze između donora i akceptora.⁷ Na slici 1 prikazani su primjeri donora i akceptora vodikove veze pri oblikovanju DES-ova.



Slika 1. Primjeri spojeva za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala²

2.2.1. Kolin-klorid

Kolin-klorid je bezbojni ili bijeli kristalasti prah s blagim mirisom amina, koji podsjeća na miris ribe. Privlači vlagu iz okoline, dakle higroskopan je. Vrlo je topljiv u vodi te disocira na pozitivno nabijen kolinski ion i negativno nabijen kloridni ion. Prisutan je u širokom spektru namirnica koje se često konzumiraju, a posebno visoke koncentracije nalaze se u ljudskom mlijeku, jajima i pšeničnim klicama. Često se primjenjuje kao dodatak prehrani, sam ili kao dio prerađene hrane. Također se upotrebljava kao djelomična zamjena i pojačivač okusa natrijeva klorida u grickalicama, pekarskim proizvodima i drugim vrstama prerađenih organskih prehrambenih proizvoda s ciljem smanjenja ukupnog sadržaja natrija.⁸ Potrošači ne moraju brinuti o upotrebi kolin-klorida kao dodatka prehrani. Mogućnost inhalacijskog trovanja kao posljedice izlaganja kolin-kloridu tijekom pripreme minimalna je budući da čestice iz primijenjenih formulacija vjerojatno neće dospjeti u alveole. Izlaganje gornjih dišnih puteva kolin-kloridu nije rezultiralo štetnim učincima. Vodene otopine kolin-klorida koncentracija do 70 % ne nadražuju oči ili kožu. Iako ne postoje studije, nema naznaka da bi i koncentriranije formulacije kolin-klorida ili čvrsti kolin-klorid bili iritansi. Međutim, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost senzibilizacije kože uslijed profesionalne izloženosti kolin-kloridu. Primjena kolin-klorida u prehrani životinja ne bi trebala značajno povećati njegovu koncentraciju u okolišu; dakle, nema predviđenog rizika za okoliš.⁹ Molekulska formula kolin-klorida je $C_5H_{14}NOCl$, molekulska masa mu je 139,63 g/mol, nasipna gustoća iznosi 0,789 g/cm³, atmosfersko talište procijenjeno mu je između 302,0 i 305,0 °C, a CAS-broj mu je 67-48-1⁹

2.2.2. Betain

Betain, također poznat kao trimetilglicin, može se naći u obliku bezbojnih kristala ili bijelog kristalnog praha. Higroskopan je, nema prepoznatljiv miris i slatkog je okusa. Betain je dobio ime po svojoj prvoj ekstrakciji iz šećerne repe (*Beta vulgaris*). Više od 50 godina upotrebljava se kao dodatak hrani za životinje. Privukao je veliku pozornost zbog svoje važnosti u metabolizmu životinjskih proteina i lipida. Dodatkom betaina u hranu za piliće poboljšava se njezin okus i iskorištenje, ukupna tjelesna masa brojlera te udio pilećih prsa u ukupnoj masi. Kod mnogih organizama služi kao regulator osmotskog tlaka; primjerice, može ublažiti stres povezan s gastrointestinalnim sustavom te povećati otpornost mladih račića i riba na stresore kao što su hladnoća, vrućina, bolesti i dr. Betain je

aktivni sastojak zubne paste koji ublažava subjektivan osjećaj suhoće usta. Upotrebljava se za tretman homocistinurije, nasljednog poremećaja metabolizma aminokiseline metionina. Također se primjenjuje za jačanje imunološkog sustava, a pomaže pri prevenciji nekancerogenih tumora debelog crijeva. Primjenjuje se za povećanje viskoznosti i kao aktivator pjene u proizvodima za osobnu higijenu. Obično se nalazi u sredstvima za čišćenje kože, šamponima i pjenama za kupanje.¹⁰ Molekulska formula mu je $C_5H_{10}NO_2$, molekulska masa 117,15 g/mol, nasipna gustoća betaina iznosi 0.7-0.75 g/cm³, atmosfersko talište mu je procijenjeno na 293 °C, a CAS-broj mu je 107-43-7.

2.2.3. Etilen-glikol

Etilen-glikol je bezbojna, prozirna kapljevina ugodna slatkasta okusa. Higroskopan je i topljiv u vodi, alkoholima, glicerolu, octenoj kiselini, acetonu i sličnim kemijskim spojevima. Blago je topljiv u eteru, ali je gotovo netopljiv u benzenu i njemu sličnim kemikalijama, kloriranim ugljikovodicima, petroleteru te uljima. Etilen-glikol se primarno upotrebljava kao sredstvo protiv smrzavanja i kao sirovina za proizvodnju poliesterskih vlakana i plastike. Etilen-glikol se često primjenjuje kao zamjena za glicerol te kao hidratantno sredstvo i otapalo u farmaceutskoj industriji. Etilen-glikol se može dodati hidrauličkim tekućinama na bazi ulja za sprečavanje njihova korozivnog djelovanja na gumu. Hidraulička tekućina na bazi vode s etilen-glikolom je nezapaljiva i stoga pogodna za primjenu u strojevima za injekcijsko prešanje, u zrakoplovima, automobilima i u visokotemperaturnim procesima. Etilen-glikol se još upotrebljava za proizvodnju sintetičkih smola, otapala, maziva, površinski aktivnih tvari, omekšivača itd.¹¹ Molekulska formula mu je $C_2H_6O_2$, molekulska masa iznosi 62,07 g/mol, gustoća mu je 1,113 g/cm³ pri 25 °C, atmosfersko vrelište 195-198 °C, a CAS-broj mu je 107-21-1.

2.2.4. Propilen-glikol

Propilen-glikol je higroskopna, viskozna, netoksična kapljevina, mješljiva s vodom, acetonom, etil-acetatom i kloroformom. Topljiv je u eteru i raznim eteričnim uljima, no ne miješa se s petroleterom niti parafinskim uljem. Propilen-glikol je važna sirovina za proizvodnju nezasićenih poliestera, epoksidnih smola i poliuretanskih smola. Nezasićeni poliesteri na osnovi propilen-glikola naširoko se upotrebljavaju kao polimerne matrice za

ojačanu duromernu plastiku i površinske premaze. Primjenu pronalazi i kao mazivo i otapalo u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. U prehrambenoj se industriji propilen-glikol uglavnom upotrebljava kao emulgator te je pogodno otapalo za arome i pigmente. U farmaceutskoj industriji primjenjuje se u proizvodnji raznih vrsta masti te kao otapalo i omekšivač za kozmetiku. Propilen-glikol se između ostalog upotrebljava kao ovlaživač duhana, antifungicid, mazivo za opremu za preradu hrane i otapalo za tintu za označavanje hrane.¹² Molekulska formula mu je $C_3H_8O_2$, molekulska masa 76,09 g/mol, gustoća 1,036 g/cm³, atmosfersko vrelište 187 °C, a CAS-broj: 57-55-6.

2.3. Kamilica

Dugogodišnja popularnost biljne medicine može se pripisati svojstvu biljaka da djeluju polagano i to uglavnom s minimalnim toksičnim nuspojavama. Jedna od najčešćih biljaka koja se upotrebljava u medicinske svrhe je kamilica; ekstrakti potječu od suhih cvjetova vrste *Matricaria recutita*. Smatra se jednom od najstarijih ljekovitih biljaka na planeti, a njezina učinkovitost opsežno je dokumentirana. Tradicionalno, kamilica se već stoljećima upotrebljava kao sredstvo protiv upale i starenja. Kao tradicionalni lijek primjenjuje se za liječenje rana, čireva, ekcema, gihta, iritacija kože, modrica, opekline, afti, neuralgije, išijasa, reumatskih bolova, mastitisa i drugih bolesti. Osim toga, kamilica može služiti i za vanjsku primjenu, primjerice za pelenski osip, ispucale bradavice, vodene kozice, vanjske infekcije, poremećaje očiju uključujući začepljene suzne kanale, konjunktivitis, upalu nosa i iritaciju otrovnim bršljanom (kontaktni dermatitis). Također se upotrebljava za liječenje upala kože, usta i pluća, kao i raznih infekcija kože, usta, pluća i dišnog sustava. Kamilica se učestalo primjenjuje i kao blagi sedativ za smirenje živaca i smanjenje anksioznosti, a liječi i nesanicu i druge probleme sa spavanjem. Smatra se opuštajućim dodatkom koji također potiče probavu, primjenjuje se za rješavanje raznih problema povezanih s probavnim sustavom, uključujući nadutost, probavne smetnje, anoreksiju, mučninu i povraćanje. Isto tako, kamilica se primjenjuje za ublažavanje grčeva i dječje (trodnevne) groznice.¹³

2.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su aromatski sekundarni biljni metaboliti široko rasprostranjeni u cijelom biljnom carstvu.¹⁴ Podskupina su polifenola kao spojeva koji sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina (-OH) izravno vezanih na jedan ili više aromatskih ugljikovodičnih prstenova.¹⁵ Fenolne kiseline su klasa spojeva nastalih zamjenom vodikovih atoma na benzenskom prstenu karboksilnom skupinom te najmanje jednom hidroksilnom skupinom.¹⁶ Derivati su benzojeve i cimetine kiseline.¹⁷ Najrasprostranjeniji derivati benzojeve kiseline su *p*-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina i galna kiselina, dok uobičajeni derivati cimetine kiseline uključuju *p*-kumarinsku kiselinu, kofeinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu i sinapinsku kiselinu. Derivati se razlikuju po stupnju hidroksilacije i metoksilacije aromatskih prstenova.¹⁸ U tradicionalnoj medicini primjenjuje se klorogenska kiselina (engl. *chlorogenic acid*, CGA). Lako je dostupna fitokemikalija i može se izolirati iz lišća i plodova biljaka kao što su zrna kave, jabuke, artičoke, mrkve i dr. Unatoč niskoj oralnoj bioraspoloživosti (otprilike 33 %), privukla je značajnu pozornost zbog svojih širokih bioloških aktivnosti i brojnih molekulskih meta.¹⁹ Druge fenolne kiseline, poput benzojeve kiseline, feniloctene kiseline i cimetine kiseline, imaju visoku bioraspoloživost i dobru topljivost u vodi te se mogu apsorbirati u želucu. Fenolne se kiseline smatraju izvrsnim antioksidansima koji mogu eliminirati tjelesna oštećenja i kronične bolesti uzrokovane prekomjernim slobodnim radikalima.¹⁷

2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi se ubrajaju u sekundarne metabolite. Uglavnom su sastavljeni od benzopironskih prstenova koji sadrže fenolne ili polifenolne skupine na različitim položajima. Najčešće se nalaze u voću, bilju, stabljikama, žitaricama, orašastim plodovima, povrću, cvijeću i sjemenkama. Upravo bioaktivne fitokemikalije prisutne u tim različitim dijelovima biljaka daju im njihovu ljekovitu vrijednost i biološku aktivnost. Do danas je izolirano i identificirano više od 10 000 flavonoida. Brojni flavonoidi široko su prihvaćeni kao terapijska sredstva.²⁰ Za razliku od fenolnih kiselina, flavonoidi se ne mogu apsorbirati u želucu, te se samo male količine flavonoida pasivno transportiraju kroz stijenku crijeva u krv. Na većinu flavonoida utječu pH, probavni enzimi i crijevni mikrobi, što uzrokuje cijepanje na fenolne kiseline prije nego što se apsorbiraju u krvotok.¹⁷ Upotrebljavaju se u prirodnim bojama, kozmetici i proizvodima za njegu kože te sredstvima

protiv bora. Međutim, najistaknutija primjena tih polifenola je u medicini. Flavonoidi se široko upotrebljavaju kao antikancerogena, antibakterijska, antivirusna, antimalarijska, antioksidativna, neuroprotektivna i antitumorska sredstva. Također mogu spriječiti kardiometaboličke poremećaje i bolje očuvati kognitivne sposobnosti pri starenju. Flavonoidi se dijele u različite skupine na temelju njihove kemijske strukture, stupnja nezasićenosti i stupnja oksidacije karbocikličkih prstenova. Šest glavnih skupina su flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli i antocijanini. Česta konzumacija hrane bogate flavonoidima ima mnoge zdravstvene prednosti. Zbog pozitivnih učinaka tih prirodnih spojeva na ljudsko zdravlje sve su veći naponi da se oni izoliraju iz različitih biljaka.²¹

Apigenin je flavon koji se prvenstveno nalazi u biljkama. Često se ekstrahira iz biljke *Matricaria recutita* (kamilica). U hrani i bilju, apigenin se često nalazi u stabilnijem obliku derivata apigenin-7-*O*-glukozida. Iako postoji nekoliko kliničkih ispitivanja na ljudima vezano uz učinke apigenina kao pojedinačnog spoja (barem djelomično zbog njegove nepostojanosti u izoliranom obliku), prekliničke studije sugeriraju da apigenin može povoljno utjecati na brojna zdravstvena stanja, uključujući tjeskobu, funkciju mozga, oksidativni stres, upale i hormonsku regulaciju.²²

2.3.3. Treslovine

Uz flavonoide, postoji još jedna kategorija polifenola koja pridonosi gorčini i trpkosti u biljkama i hrani, a nazivaju se treslovine ili tanini.²¹ Polifenolni spojevi poznati kao treslovine prisutni su u brojnim biljkama kao sekundarni metaboliti. Budući da su topljivi u vodi, lako se ekstrahiraju te imaju širok raspon primjene u kemijskoj i farmaceutskoj industriji.²² Općenito se dijele u dvije skupine: tanini koji se mogu hidrolizirati i tanini koji se ne mogu hidrolizirati. Hidrolizirajući tanini proizvod su esterifikacije šećera kao što je glukoza jednostavnim fenolnim kiselinama. Tanini koji se ne mogu hidrolizirati, također poznati kao kondenzirani tanini, nastaju reakcijama polimerizacije (kondenzacije) flavonoida.²¹ Treslovine imaju sposobnost koagulacije proteina i sluzavog vezivnog tkiva, stvarajući zaštitni i izolacijski sloj koji ublažava bol i iritaciju kože. Biljni uvarci koji sadrže treslovine upotrebljavaju se za zaustavljanje manjih hemoragija, bronhitisa, opekline, ožiljaka, ozljeda i dr. Biljke koje sadrže tanin imaju adstringentna, hemostatska, antiseptička i tonizirajuća svojstva. Također, treslovine se smatraju antioksidansima i sprečavaju pojavu degenerativnih bolesti poput raka i bolesti srca.²³

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Svrha eksperimenta bila je istraživanje mogućnosti ekstrakcije bioaktivnih komponenti, točnije fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina iz kamilice (*Matricaria recutita*) pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Ekstrakcije su najprije provedene prema farmakopejskom postupku s etanolom i vodom, a zatim primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Sadržaj bioaktivnih komponenti u oba slučaja određen je UV/VIS spektrofotometrijom. Također su određivani ekstrakcijski kapaciteti DES-ova procesom višestupanjske ekstrakcije. Osim navedenoga, u ekstraktima je određena koncentracija apigenin-7-O-glukozida tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC).

3.1. Kemikalije i reagensi

U eksperimentalnom dijelu primijenjene su sljedeće kemikalije:

- aceton (Gram-Mol)
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika)
- betain 98 % (Acros Organics)
- etanol 96 % p.a. (Gram-Mol)
- etil-acetat p.a. (Lach-Ner)
- etilen-glikol p.a. (Gram-Mol)
- Folin-Ciocalteuov reagens (Merck)
- glicerol (Gram-Mol)
- heksametilen-tetramin (Kemika)
- klorogenska kiselina, standard (Sigma-Aldrich)
- klorovodična kiselina 37 % (Carlo Erba Reagents)
- kolin-klorid, 99 % (Acros Organics)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich)
- metanol (Lach-Ner)
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika)
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich)
- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika)

- natrijev molibdat (Kemika)
- natrijev nitrit (Kemika)
- natrijev sulfat (Kemika)
- natrijev sulfat bezvodni (Zorka, Šabac, Srbija)
- octena kiselina $\geq 99,5$ % (Kemika)
- pirogalol 99 % (Sigma-Aldrich)
- propilen-glikol (Thermo Fisher Scientific)

3.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu primijenjeni su sljedeći instrumenti i laboratorijski pribor:

- analitička vaga (Mettler-Toledo)
- UV-Vis spektrofotometar (UNISPEC 2)
- vodena kupelj (Inko)
- magnetna miješalica s grijačem (LLG Labware uniSTIRRER 3)
- laboratorijska centrifuga (Hettich, EBA 3S)
- sušionik (Beko, OIE 22300)
- uređaj za tekućinsku kromatografiju (Agilent Infinity 1600)

3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola prema europskoj farmakopeji

3.3.1. Određivanje fenolnih kiselina

Erlenmeyerova tikvica okruglog dna sa 0,300 g usitnjene kamilice i 95 mL 50 %-tnog etanola stavi se u kipuću vodenu kupelj, uz povratno hladilo, te se zagrijava 30 minuta. Ohlađeni i filtrirani ekstrakt razrijedi se 50 %-tnim etanolom do 100 mL. U odmjernu tikvicu od 10 mL ulije se 1,0 mL ekstrakta, te se redom dodaje 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2,0 mL nitrito-molibdatnog reagensa i 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida. Sadržaj tikvice zatim se nadopuni vodom do oznake. Poredbena otopina pripremi se tako da se 1,0 mL ekstrakta razrijedi destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Zatim se 1,0 mL pripremljene otopine pomiješa s 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline i 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida. Ponovno se razrijedi destiliranom vodom do 10 mL. Apsorbanciju je potrebno izmjeriti odmah u odnosu na poredbenu otopinu pri 525 nm.

Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao klorogenska kiselina, izračuna se prema izrazu:

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

uzevši u obzir da specifična apsorbanacija klorogenske kiseline na 525 nm iznosi 188, pri čemu A označava apsorbanaciju ispitivane otopine na 525 nm, a m označava masu kamilice u gramima.

3.3.2. Određivanje flavonoida

Tikvica okruglog dna s 0,600 g usitnjene kamilice, 1 mL vodene otopine heksametilen-tetramina masene koncentracije 5 g/L, 20 mL acetona i 2 mL klorovodične kiseline masene koncentracije 250 g/L stavi se zagrijavati 30 minuta u kipuću vodenu kupelj, uz povratno hladilo. Zatim se sadržaj tikvice profiltrira preko manje količine pamuka te se preostali biljni materijal u tikvici i iskorišteni pamuk ponovno ekstrahira s po 20 mL acetona uz zagrijavanje od 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni ekstrakti profiltriraju se, a otopina se razrijedi acetonom do 100,0 mL. 20,0 mL acetonskog ekstrakta zatim se prebaci u lijevak za odjeljivanje i pomiješa s 20,0 mL vode. Sadržaj lijevka najprije se ekstrahira s 15 mL etil-acetata, zatim još tri puta s po 10 mL etil-acetata. Sjedinjeni etil-acetatni ekstrakti dodatno se isperu u zasebnom lijevku dva puta s po 50 mL vode, zatim se profiltriraju kroz 10 g bezvodnog natrijeva sulfata u tikvicu volumena 50,0 mL. Sadržaj se zatim dopuni etil-acetatom do oznake. U 10 mL dobivenog etil-acetatnog ekstrakta doda se 1,0 mL reagensa aluminijska klorida ($2,0 \text{ AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ otopljen u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline) te se nadopuni 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake u tikvici od 25 mL. Poredbena otopina pripremi se tako da se 10 mL etil-acetatnog ekstrakta razrijedi s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do 25 mL. Apsoorbanciju je potrebno izmjeriti nakon 30 minuta u odnosu na poredbenu otopinu pri 425 nm. Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercitozid, izračuna se prema izrazu:

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

uzevši u obzir da specifična apsorbanacija izokvercitozida na 425 nm iznosi 500, pri čemu A označava apsorbanaciju ispitivane otopine na 425 nm, a m označava masu kamilice u gramima.

3.3.3. Određivanje treslovina

Tikvica okruglog dna zajedno sa 1,000 g suhe usitnjene kamilice i 150 mL vode stavi se u kipuću vodenu kupelj, uz povratno hladilo. Nakon 30 minuta ekstrakt se ohladi i potom se kvantitativno prelije u odmjernu tikvicu gdje se razrijedi vodom do 250 mL. Nakon što se čestice istalože ekstrakt se profiltrira preko filter-papira, a prvih se 50 mL filtrata baci. 5 mL filtrata razrijedi se vodom do 25 ml, a 2,0 mL te otopine pomiješa se s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL. Zatim se otopinom natrijeva karbonata masene koncentracije 290 g/L nadopuni do oznake. Apsorbancija se mjeri nakon 30 minuta uz vodu kao poredbenu otopinu pri 760 nm (A_1). Tikvica s 10,0 mL filtrata i 0,10 g kožnog praška stavi se mućkati 60 minuta na laboratorijskoj tresilici. Sadržaj tikvice se profiltrira, a 5,0 mL filtrata razrijedi se s vodom do 25,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25 mL pomiješa se 2,0 mL pripremljene otopine s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode. Nadopuni se otopinom natrijeva karbonata masene koncentracije 290 g/L do oznake te se također nakon 30 minuta izmjeri apsorbancija uz vodu kao poredbenu otopinu pri 760 nm (A_2). Nadalje, otopi se 50,0 mg pirogalola u vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. 5,0 mL dobivene otopine razrijedi se vodom do 100 mL. 2,0 mL te otopine pomiješa se u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode. Nadopuni se otopinom natrijeva karbonata masene koncentracije 290 g/L do oznake. Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta uz vodu kao poredbenu otopinu pri 760 nm (A_3). Postotni udio treslovina, izražen kao pirogalol, izračuna se prema izrazu:

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

pri čemu m_1 označava masu ispitivanog uzorka u gramima, a m_2 masu pirogalola u gramima.

3.4. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz kamilice niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Najprije su se pripremila niskotemperaturna eutektička otapala potrebna za ekstrakciju. Otapala su pripremljena miješanjem komponenata na magnetnoj miješalici u odgovarajućem molarnom omjeru pri 90-95 °C. Pripremljena su dva tipa otapala, jedan na bazi kolin-klorida (HBA) s etilen-glikolom (HBD), a drugi na bazi betaina (HBA) s propilen-glikolom (HBD). DES-ovi na bazi kolin-klorida i etilen-glikola pripremljeni su u molarnim omjerima 1:3; 1:4 i

1:5, a DES-ovi na bazi betaina i propilen-glikola pripremljeni su u molarnim omjerima 1:3,5; 1:4 i 1:5. Sastavi DES-ova odabrani su tako da budu kapljevitosti na sobnoj temperaturi.

Suhi, usitnjeni cvijet kamilice miješan je s 18 mL otapala na magnetnoj miješalici 30 minuta na 500 o/min pri sobnoj temperaturi. Dobiven ekstrakt centrifugiran je (2-3 minute pri 3000 o/min) te bez taloga kapalicama prebačen u bočice od 10 mL. Za određivanje koncentracije otopina bioaktivnih komponenti u odgovarajućim DES-ovima također je primijenjen farmakopejski postupak. Kod određivanja fenolnih kiselina umjesto mase suhe usitnjene kamilice od 0,300 g uzet je volumen ekstrakta od 0,5 mL. Zatim, kod određivanja flavonoida umjesto mase suhe usitnjene kamilice od 0,600 g uzet je volumen ekstrakta od 2,0 mL. Konačno, kod određivanja treslovina umjesto mase suhe usitnjene kamilice od 1,000 g uzet je volumen ekstrakta od 0,4 mL. Odmjereni volumeni ekstrakata izvagani su za potrebe računa. Radi usporedbe provedla se i ekstrakcija etanolom gore opisanom postupkom, uz volumen etanola od 6 mL.

U tablici 1. nabrojani su provedeni ekstrakcijski pokusi s obzirom na masu suhe tvari kamilice i sastav DES-ova.

Tablica 1. Provedeni ekstrakcijski pokusi s obzirom na masu kamilice i sastav DES-ova.

Otapalo	Masa kamilice	Otapalo	Masa kamilice
ChCl : EG 1:3	1,0	B :PG 1:3,5	0,5
ChCl : EG 1:3	1,5	B :PG 1:3,5	1,0
ChCl : EG 1:3	2,16	B :PG 1:3,5	1,5
ChCl : EG 1:4	1,0	B :PG 1:4	0,5
ChCl : EG 1:4	1,5	B :PG 1:4	1,0
ChCl : EG 1:4	2,16	B :PG 1:4	1,5
ChCl : EG 1:5	1,0	B :PG 1:5	0,5
ChCl : EG 1:5	1,5	B :PG 1:5	1,0
ChCl : EG 1:5	2,16	B :PG 1:5	1,5

3.5. Određivanje ekstrakcijskog kapaciteta DES-ova

Mogućnost uporabe jedne šarže niskotemperaturnih eutektičkih otapala za višestupanjsku ekstrakciju bez potrebe za pročišćavanjem otapala između ekstrakcijskih stupnjeva ovisi o ekstrakcijskom kapacitetu. U tom slučaju ekstrahirane komponente postupno će se apsorbirati u otapalu, sve dok ne dosegnu ravnotežnu koncentraciju koja onemogućuje

daljnju ekstrakciju. Ispitivanje ekstrakcijskog kapaciteta provedeno je na način da se najprije na magnetnoj miješalici 30 minuta ekstrahiralo 2,16 g suhe tvari u 18 ml DES-a nakon čega je proveden farmakopejski postupak određivanja sastava ekstrakta kao u koraku 3.4. Nakon toga je u ostatak ekstrakta dodana nova odgovarajuća količina suhe tvari te je ponovljen farmakopejski postupak određivanja bioaktivnih komponenti. Višestupanjska ekstrakcija provodila se sve do postizanja stalne koncentracije fenolnih kiselina ili flavonoida. Određivanje ekstrakcijskog kapaciteta provedeno je s DES-ovima iz obaju tipova u molarnim omjerima koji su se pokazali najboljima za ekstrakciju fenolnih kiselina i flavonoida, a to su ChCl:EG 1:5 i B:PG 1:5 za ekstrakciju fenolnih kiselina te ChCl:EG 1:3 i B:PG 1:5.

3.6. Određivanje koncentracije apigenin-7-O-glukozida

Apigenin-7-O-glukozid je relativno stabilan derivat apigenina, flavona karakterističnog za kamilicu te je osim sadržaja fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina također određena njegova koncentracija u dosad navedenim ekstraktima na bazi DES-ova. Za određivanje je primijenjena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), separacijska tehnika koja uz pomoć pumpe osigurava da otapalo putuje pod visokim tlakom. Na taj se način skraćuje vrijeme odjeljivanja komponenti i poboljšava razlučivanje.

Identifikacija i kvantifikacija apigenin-7-O-glukozida u ekstraktima kamilice provedena je na uređaju za tekućinsku kromatografiju opremljenom sustavom za automatsko injektiranje uzorka, kvarternom pumpom, pećnicom i detektorom s nizom dioda prema prethodno opisanoj metodi.²⁴ Analiza je provedena na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6x250 mm, veličina čestica 5 µm, Agilent Technologies). Mobilna faza A sastojala se od 5 %-tne octene kiseline u acetonitrilu u omjeru 85:15, dok se faza B sastojala od 5 %-tne octene kiseline u metanolu. Eluiranje je provedeno prema linearnom gradijentu od 100 % A do 100 % B tijekom 50 minuta, a zatim izokratno sa 100 % B narednih 10 minuta. Protok je bio konstantan i iznosio je 1 mL/min. Apigenin-7-O-glukozid identificiran je usporedbom vremena zadržavanja i UV-spektra analiziranih ekstrakata i standardne otopine apigenin-7-O-glukozida. Prije injektiranja ekstrakti i standard filtrirani su kroz filter veličine pora 0,45 µm. Kalibracijska krivulja apigenin-7-O-glukozida dobivena je linearnom regresijom uz pet

kalibracijskih točaka i može se opisati izrazom $y = 2193,8x - 13,879$, uz determinacijski koeficijent $R^2 = 0,999$. Rezultati su izraženi kao μg apigenin-7-*O*-glukozida po mL ekstrakta.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje sadržaja bioaktivnih komponenti ekstrakcijom

DES-ovima i etanolom

U tablicama 2-4 dani su rezultati određivanja sadržaja bioaktivnih komponenti u cvijetu kamilice u različitim ekstraktima, uključujući etanol. Slike 2-4 grafički su prikazi rezultata iz tablica 2-4.

Tablica 2. Rezultati određivanja fenolne kiseline u kamilici.

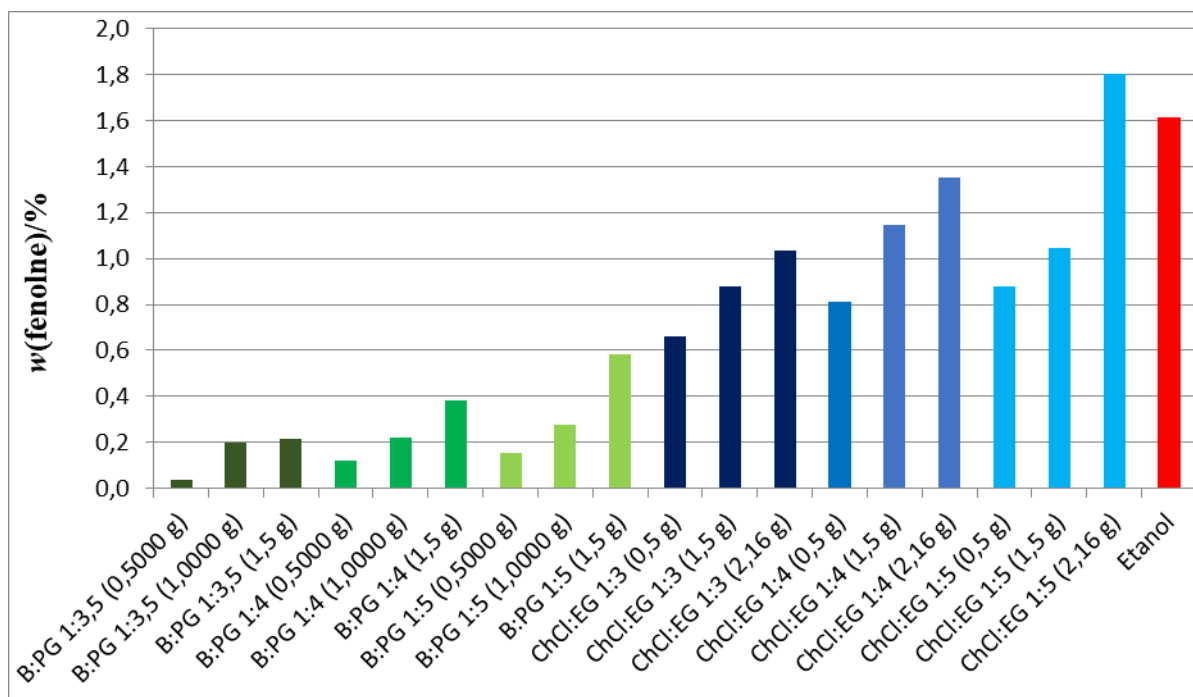
DES	<i>m</i> (suhe tvari)	<i>m</i> (ekstrakta)	A_{sr}	w/%
B:PG 1:3,5	0,5	0,5457	0,546	0,0387
	1	0,5456	0,546	0,2005
	1,5	0,5595	0,560	0,2167
B:PG 1:4	0,5	0,5289	0,529	0,1179
	1	0,5174	0,517	0,2214
	1,5	0,5188	0,519	0,3830
B:PG 1:5	0,5	0,5320	0,532	0,1509
	1	0,5170	0,517	0,2785
	1,5	0,5188	0,519	0,5810
ChCl:EG 1:3	1	0,5438	0,544	0,6596
	1,5	0,5437	0,544	0,8757
	2,16	0,5439	0,544	1,0349
ChCl:EG 1:4	1	0,5423	0,542	0,8090
	1,5	0,5300	0,53	1,1453
	2,16	0,5343	0,534	1,3505
ChCl:EG 1:5	1	0,5470	0,547	0,8775
	1,5	0,5443	0,544	1,0435
	2,16	0,4890	0,489	1,8022
Etanol	0,3006	/	0,092	1,6162

Tablica 3. Rezultati određivanja flavonoida u kamilici.

DES	$m(\text{suhe tvari})$	$m(\text{ekstrakta})$	A_{sr}	$w/\%$
B:PG 1:3,5	0,5	2,0755	1,002	0,0435
	1	2,0474	1,005	0,072
	1,5	2,0829	1,640	0,0861
B:PG 1:4	0,5	2,0811	1,995	0,0706
	1	2,1060	1,633	0,0813
	1,5	2,0589	1,905	0,0973
B:PG 1:5	0,5	2,0698	2,228	0,0670
	1	2,0793	1,542	0,1128
	1,5	2,0621	2,608	0,1237
ChCl:EG 1:3	1	2,1374	2,836	0,0984
	1,5	2,1274	2,339	0,089
	2,16	2,1982	2,105	0,0738
ChCl:EG 1:4	1	2,1937	1,803	0,0864
	1,5	2,1477	2,107	0,0745
	2,16	2,3022	1,778	0,0644
ChCl:EG 1:5	1	2,2010	1,582	0,0812
	1,5	2,2130	1,986	0,0552
	2,16	2,2106	1,359	0,0221
Etanol	0,6007	/	0,043	0,0895

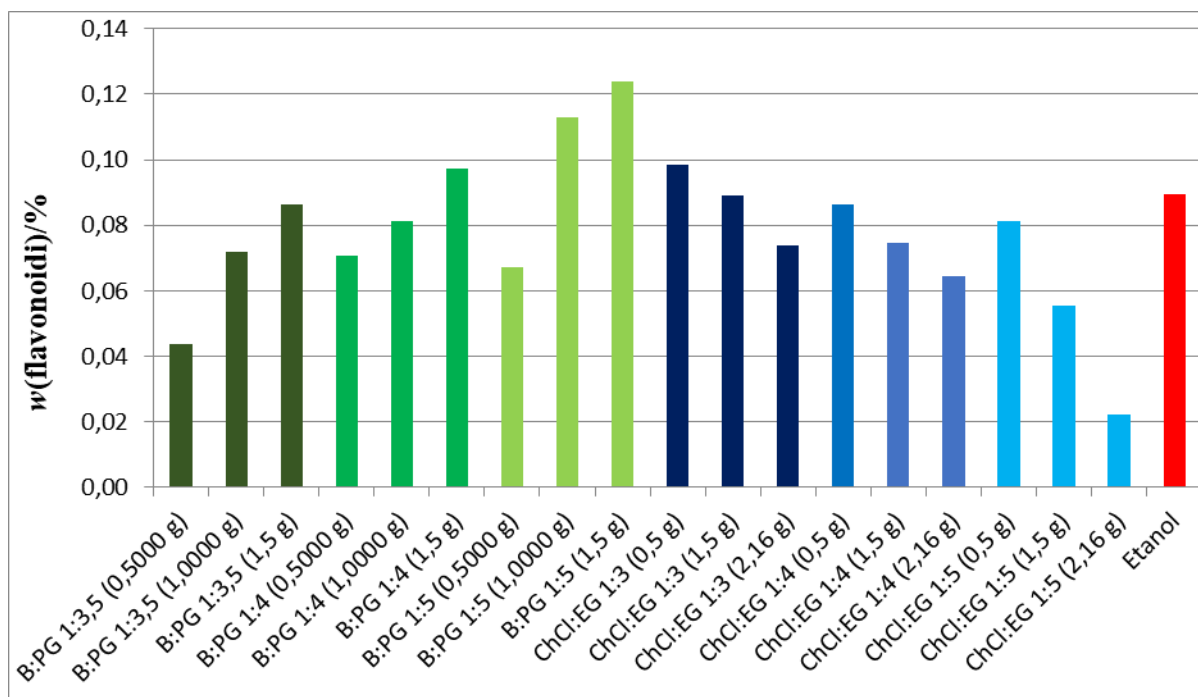
Tablica 4. Rezultati određivanja treslovina u kamilici.

DES	<i>m</i> (suhe tvari)	<i>m</i> (ekstrakta, netaninski polifenoli)	<i>m</i> (ekstrakta, ukupni polifenoli)	<i>A</i> (netaninski polifenoli)	<i>A</i> (ukupni polifenoli)	w/%
B:PG 1:3,5	0,5	0,4098	0,4788	0,798	0,812	0,1405
	1	0,414	0,5337	1,357	1,473	1,0635
	1,5	0,4562	0,5022	1,959	2,208	2,4564
B:PG 1:4	0,5	0,4036	0,4301	1,037	1,129	1,0679
	1	0,4223	0,4274	1,893	1,935	0,4951
	1,5	0,4146	0,4243	2,721	2,82	1,1367
B:PG 1:5	0,5	0,4084	0,435	1,189	1,343	1,7762
	1	0,4221	0,4529	0,509	2,103	17,3423
	1,5	0,412	0,4191	2,968	2,959	0,0587
ChCl:EG 1:3	1	0,4522	0,4186	0,173	0,634	5,2943
	1,5	0,4536	0,4213	0,320	0,754	5,0151
	2,16	0,4515	0,4146	0,213	0,172	0,4827
ChCl:EG 1:4	1	0,4751	0,4077	0,206	0,557	4,2248
	1,5	0,4622	0,4137	0,389	0,591	2,3910
	2,16	0,4447	0,4477	0,369	0,705	3,6934
ChCl:EG 1:5	1	0,4699	0,4337	0,509	0,634	1,4297
	1,5	0,4268	0,4408	1,021	1,102	0,9118
	2,16	0,4392	0,4223	0,369	1,609	14,4581
Etanol	1,0004	/	/	0,095	0,162	0,6277



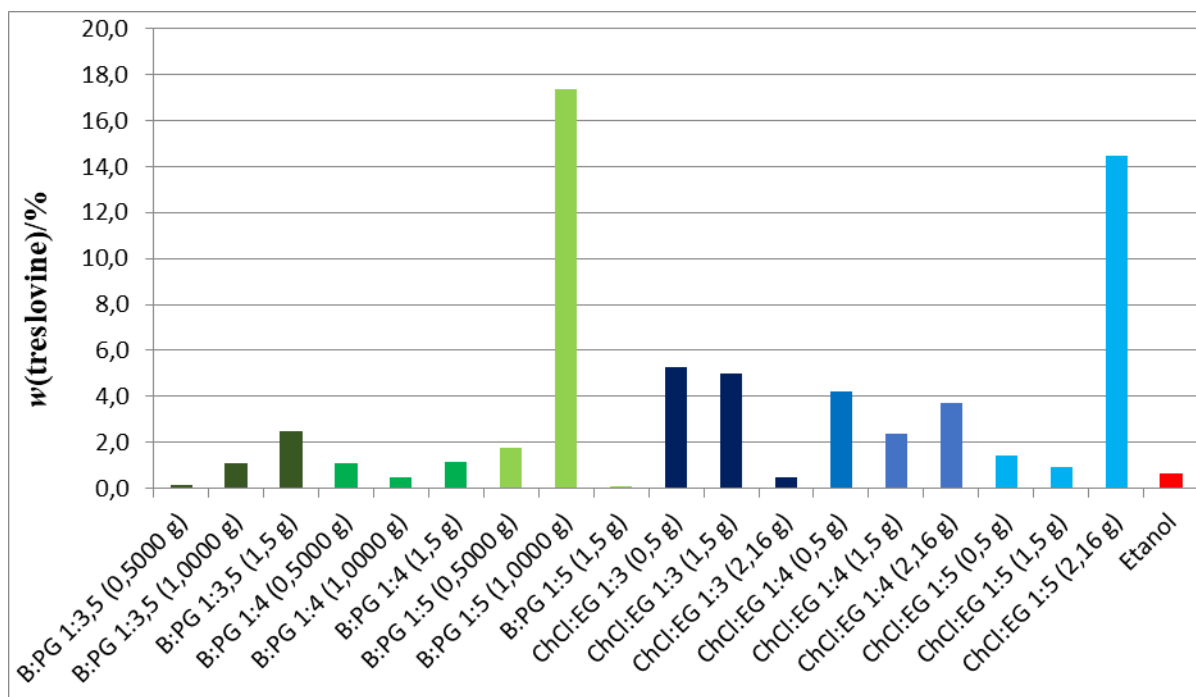
Slika 2. Sadržaj fenolnih kiselina u različitim ekstraktima cvijeta kamilice.

Na slici 2 može se uočiti da se DES ChCl:EG pokazao boljim ekstrakcijskim sredstvom za fenolne kiseline od DES-a B:PG. S obzirom na pojedini niz DES-ova, u većini slučajeva bolji rezultati dobili su se s povećanjem udjela HBD-a u DES-u. Zatim je primjetno da su se najveće koncentracije fenolnih kiselina u ekstraktu dobile s najvećom masom kamilice, odnosno s najvećim omjerom suhe tvari i otapala. Etanol se pokazao nešto lošijim ekstrakcijskim sredstvom od DES-a ChCl:EG 1:5 u kojem je ekstrahirana najveća masa kamilice, no isto tako i vrlo dobrim ekstrakcijskim sredstvom uzimajući u obzir to da se s etanolom ekstrahirala relativno mala masa suhe tvari od oko 0,3 g.



Slika 3. Sadržaj flavonoida u različitim ekstraktima cvijeta kamilice.

Na slici 3 može se uočiti da se DES B:PG pokazao boljim ekstrakcijskim sredstvom za flavonoide od DES-a ChCl:EG. Kod DES-a B:PG bolji rezultati dobili su se s povećanjem udjela HBD-a. Kod istog DES-a primjetno je da su se veće koncentracije flavonoida u ekstraktu dobile s najvećom masom kamilice, odnosno s najvećim omjerom suhe tvari i otapala. Naprotiv, za DES ChCl:EG bolji rezultati dobili su se sa smanjenjem udjela HBD-a, a veće koncentracije flavonoida u ekstraktu dobivene su s najmanjom masom kamilice, odnosno s najmanjim omjerom suhe tvari i otapala. Također, etanol se pokazao nešto lošijim otapalom od DES-a B:PG 1:5 u kojem je ekstrahirana najveća masa kamilice, no i dalje je u razini s većinom DES-ova.

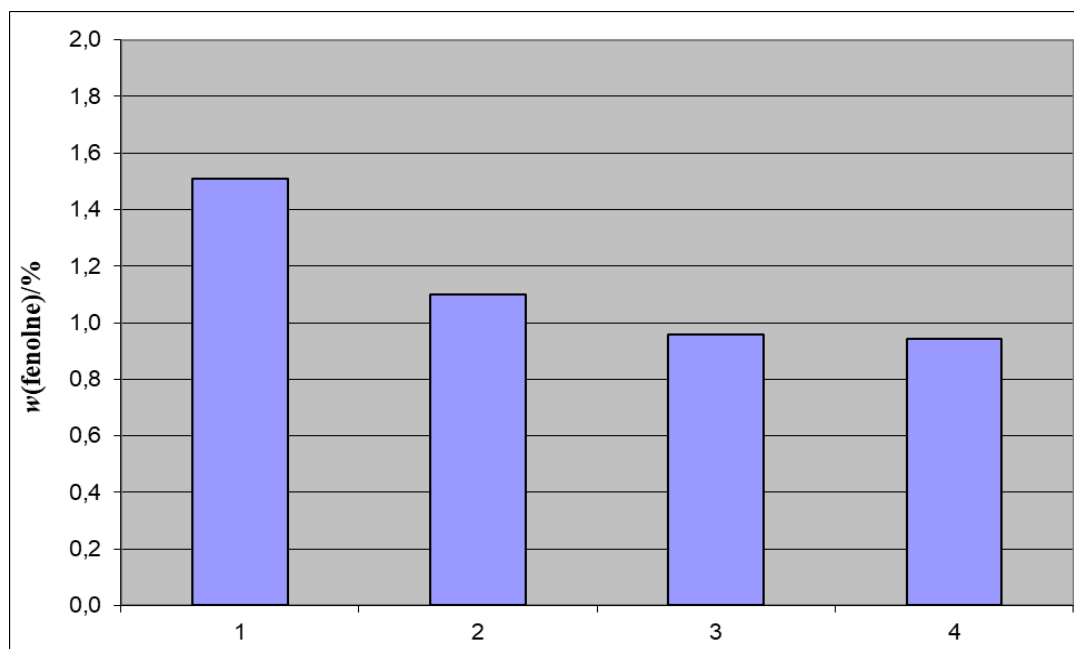


Slika 4. Sadržaj treslovina u različitim ekstraktima cvijeta kamilice.

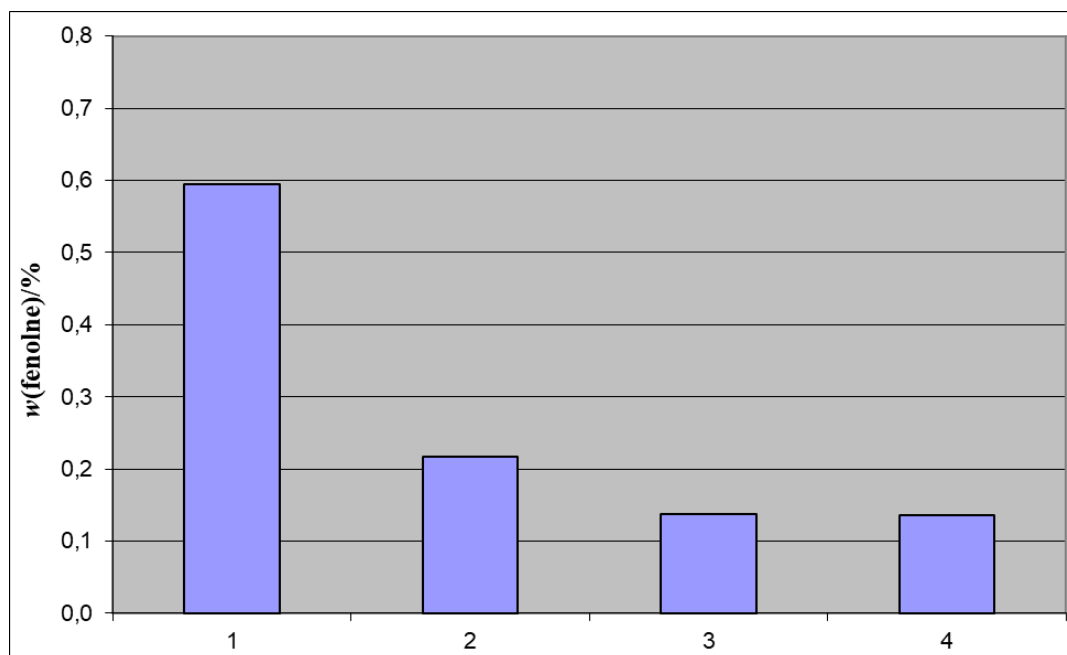
Na slici 4, za razliku od prethodne dvije slike, uočavaju se velike oscilacije rezultata što može biti posljedica nepovoljnih interakcija nekih od DES-ova s treslovinama u kamilici. Kao najbolja otapala za ekstrakciju treslovina osobito se izdvajaju DES-ovi B:PG 1:5 i ChCl:EG 1:5. Također se može uočiti da su u većini slučajeva dobiveni bolji rezultati nego s etanolom.

4.2. Određivanje ekstrakcijskog kapaciteta DES-ova

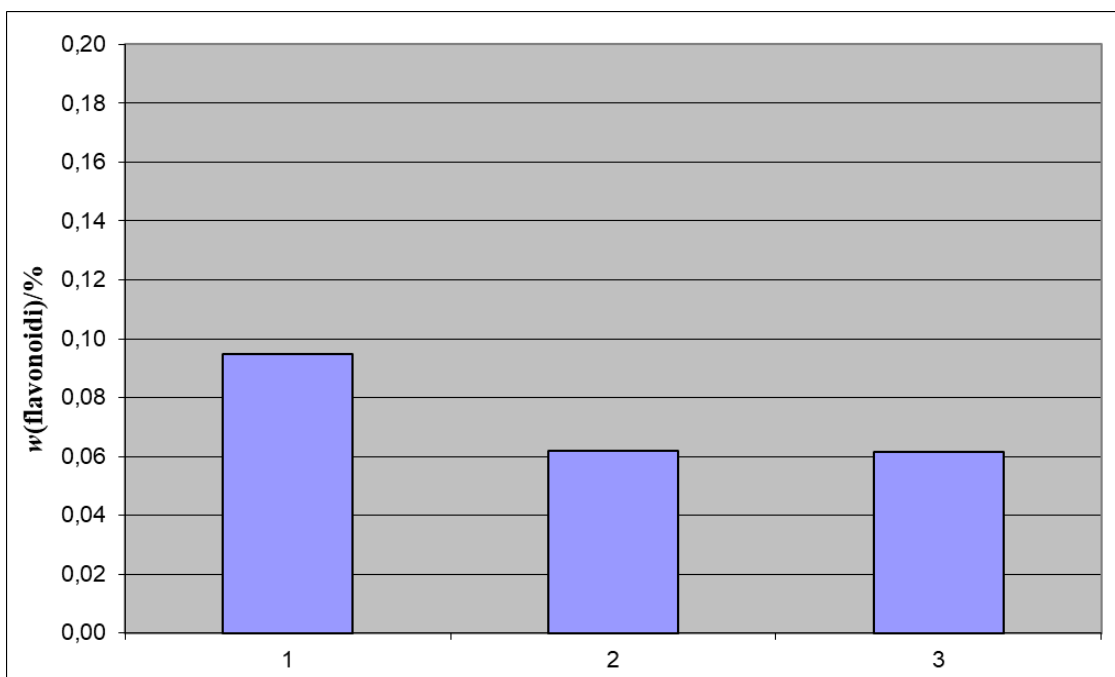
Na slikama 5-8 prikazane su ovisnosti koncentracija fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktu o broju ekstrakcijskih stupnjeva.



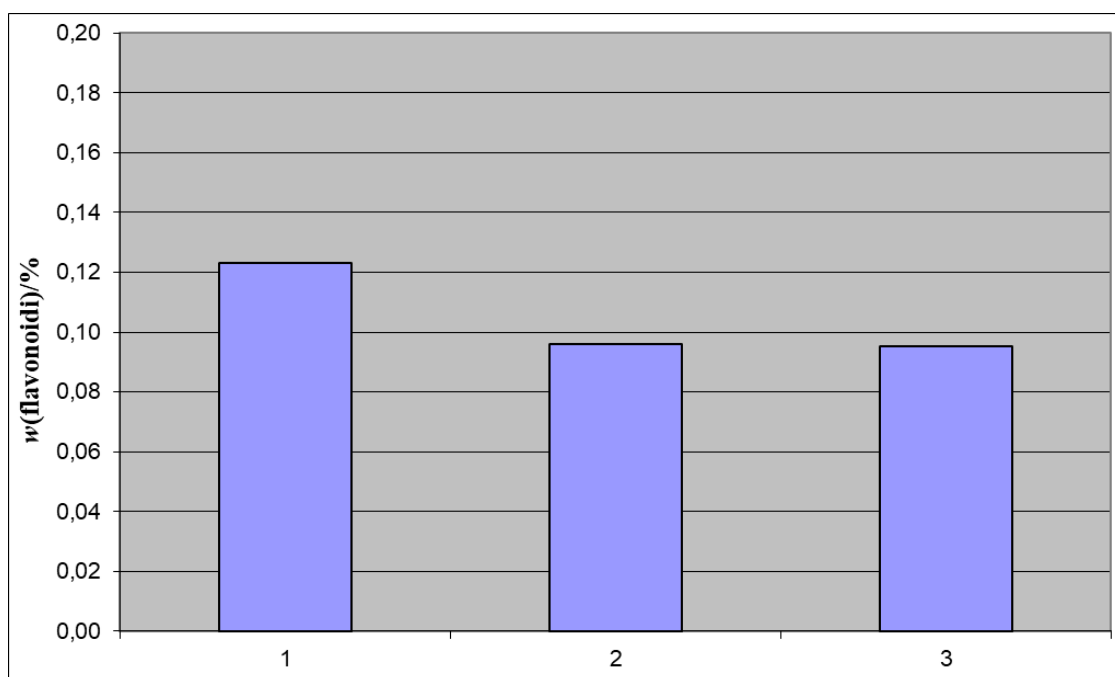
Slika 5. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu na bazi DES-a ChCl:EG 1:5 kao funkcija broja ekstrakcijskih stupnjeva.



Slika 6. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu na bazi DES-a B:PG 1:5 kao funkcija broja ekstrakcijskih stupnjeva.



Slika 7. Sadržaj flavonoida u ekstraktu na bazi DES-a ChCl:EG 1:3 kao funkcija broja ekstrakcijskih stupnjeva.



Slika 8. Sadržaj flavonoida u ekstraktu na bazi DES-a B:PG 1:5 kao funkcija broja ekstrakcijskih stupnjeva.

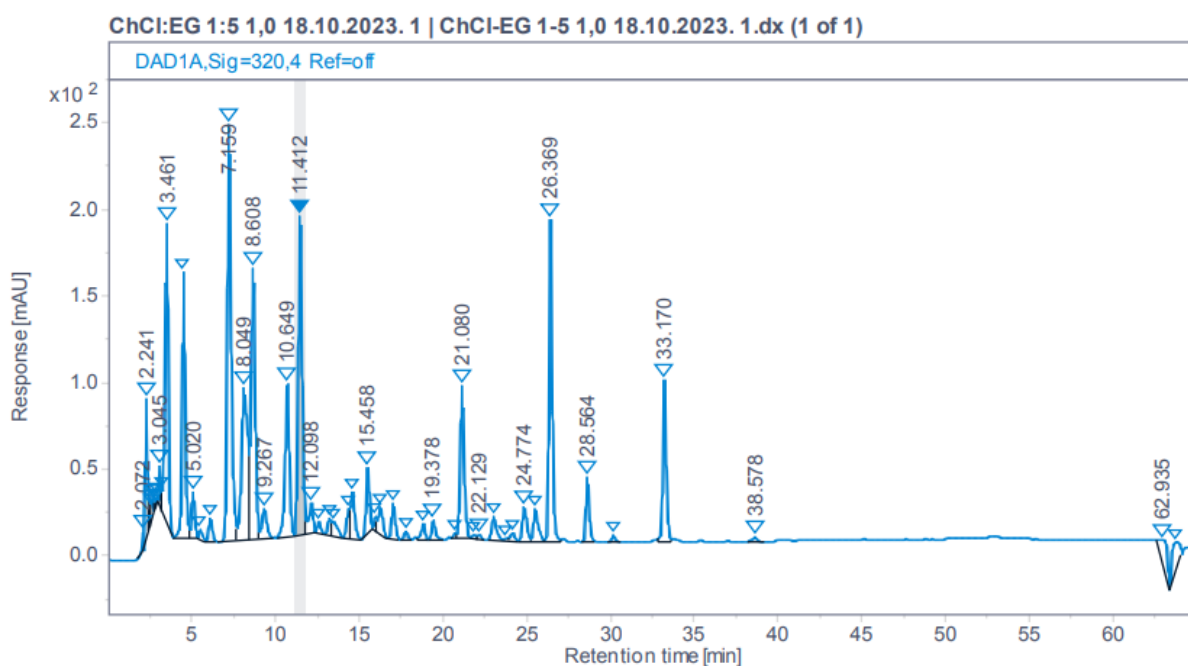
Slike 5-8 prikazuju smanjenje sadržaja bioaktivnih komponenti u ekstraktima s povećanjem broja ekstrakcijskih stupnjeva, suprotno od očekivanoga povećanja. To bi moglo značiti da je već u prvom stupnju dosegnut ravnotežni kapacitet ekstrakcije, a da se u daljnjim

stupnjevima opaža djelomična razgradnja nestabilnih ekstrahiranih tvari. Međutim, potrebne su detaljnije analize za dokazivanje te pretpostavke.

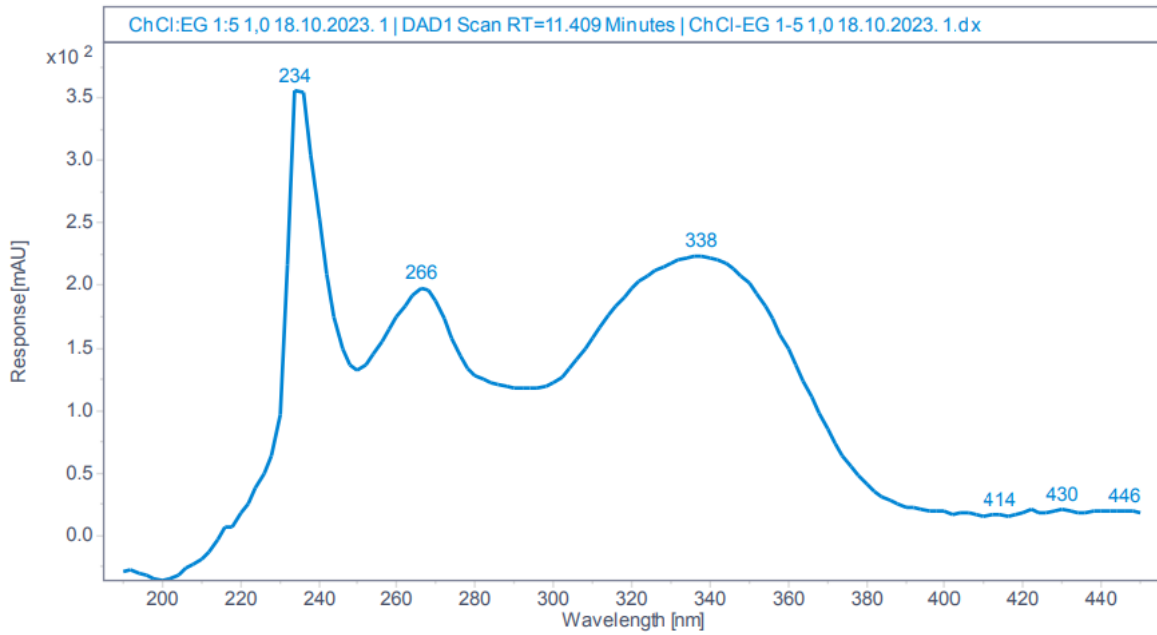
4.3. Određivanje koncentracije apigenin-7-*O*-glukozida

Koncentracije apigenin-7-*O*-glukozida u ekstraktima navedenim u tablici 1 određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri valnoj duljini od 320 nm. Eksperimenti rezultiraju kromatogramima na kojima se prema retencijskim vremenima lako uočavaju pikovi istraživanog derivata apigenina. Međutim uz retencijska vremena postoje i karakteristični UV-spektri bioaktivnih komponenata koji također ukazuju na prisutnost apigenin-7-*O*-glukozida u ekstraktima.

Na slici 9 prikazan je primjer kromatograma za ekstrakt na bazi DES-a ChCl:EG 1:5, a na slici 10 prikaz UV-spektra apigenin-7-*O*-glukozida u ekstraktu ChCl:EG 1:5 s 1,0 g suhe tvari.

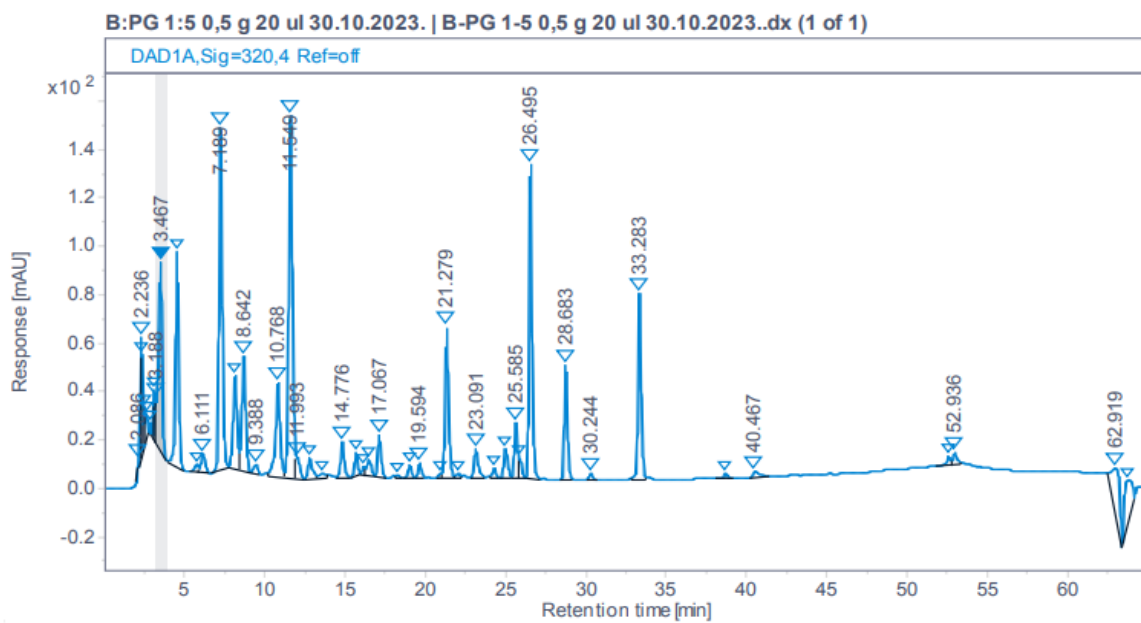


Slika 9. Primjer kromatograma dobivenog tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:5 s 1,0 g suhe tvari kamilice.

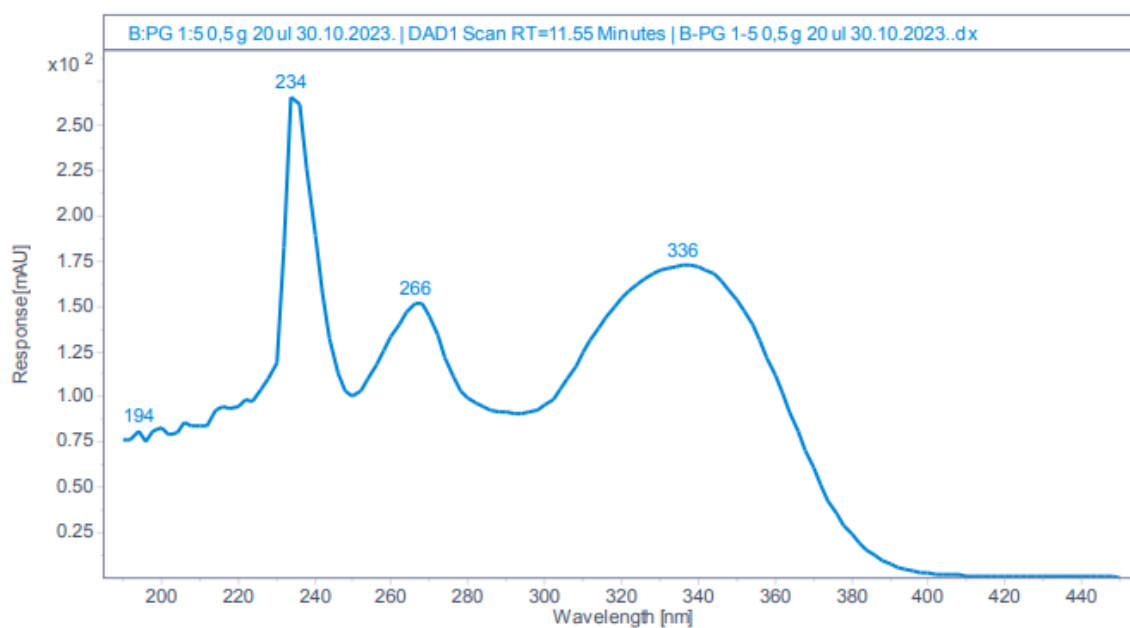


Slika 10. Prikaz UV-spektra apigenin-7-O-glukozi u DES-u ChCl:EG 1:5

Na slici 11. prikazan je primjer kromatograma za ekstrakt na bazi DES-a B:PG 1:5, a na slici 12 prikaz UV-spektra apigenina-7-O-glukozi u ekstraktu B:PG 1:5 s 0,5 g suhe tvari.

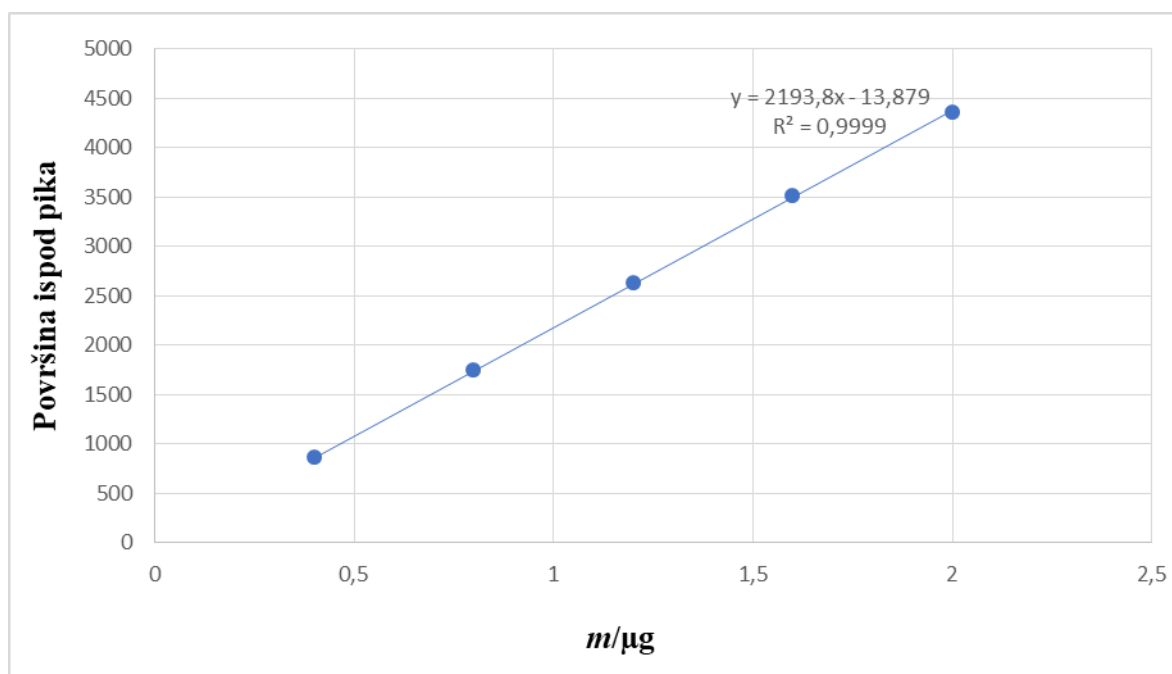


Slika 11. Primjer kromatograma dobivenog tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:PG 1:5 s 0,5 g suhe tvari kamilice.



Slika 12. Prikaz UV-spektra apigenin-7-*O*-glukozida u DES-u B:PG 1:5

Na slici 13 prikazan je baždarni pravac apigenin-7-*O*-glukozida dobiven iz standarda, Api-7-glu 0.49 mg u 2.45 mL MeOH, s retencijskim vremenom od 11,535 min.

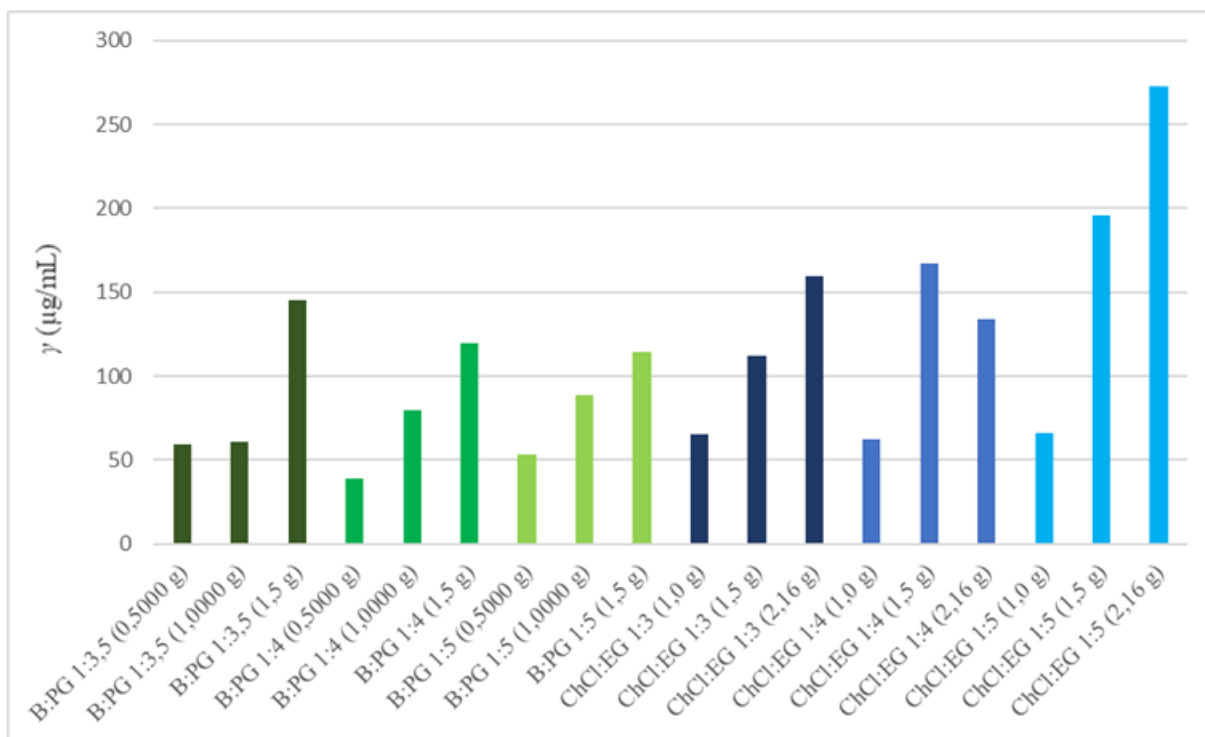


Slika 13. Baždarni pravac apigenin-7-*O*-glukozida

U tablici 5 prikazane su površine ispod pika i odgovarajuće masene koncentracije apigenin-7-*O*-glukozida za svaki istražen ekstrakt. Rezultati iz tablice grafički su prikazani na slici 14.

Tablica 5. Površine ispod pika i njihove odgovarajuće masene koncentracije apigenin-7-*O*-glukozida za istražene ekstrakte.

Ekstrakt	Površina ispod pika	Volumen injektiranja (μL)	$m(\mu\text{g po injektiranom volumenu})$	$m(\mu\text{g/mL})$
B:PG 1:3,5 (0,5000 g)	2568,927	20	1,18	58,89
B:PG 1:3,5 (1,0000 g)	2656,804	20	1,22	60,90
B:PG 1:3,5 (1,5 g)	6352,642	20	2,90	145,17
B:PG 1:4 (0,5000 g)	1699,421	20	0,78	39,07
B:PG 1:4 (1,0000 g)	3479,037	20	1,59	79,65
B:PG 1:4 (1,5 g)	5239,817	20	2,40	119,79
B:PG 1:5 (0,5000 g)	2335,392	20	1,07	53,57
B:PG 1:5 (1,0000 g)	3891,727	20	1,78	89,06
B:PG 1:5 (1,5 g)	5010,302	20	2,29	114,56
ChCl:EG 1:3 (1,0 g)	1418,863	10	0,65	65,34
ChCl:EG 1:3 (1,5 g)	1212,746	5	0,56	112,00
ChCl:EG 1:3 (2,16 g)	1387,5	4	0,64	159,77
ChCl:EG 1:4 (1,0 g)	1346,401	10	0,62	62,03
ChCl:EG 1:4 (1,5 g)	1821,19	5	0,84	167,37
ChCl:EG 1:4 (2,16 g)	1457,406	5	0,67	134,19
ChCl:EG 1:5 (1,0 g)	2897,621	20	1,33	66,39
ChCl:EG 1:5 (1,5 g)	4278,205	10	1,96	195,74
ChCl:EG 1:5 (2,16 g)	2979,047	5	1,36	272,98



Slika 14. Masena koncentracija apigenin-7-*O*-glukozida u različitim ekstraktima.

Na grafičkom prikazu može se uočiti da se DES ChCl:EG pokazao boljim ekstrakcijskim sredstvom od DES-a B:PG što nije slučaj kod određivanja ukupnih flavonoida, a kvaliteta ekstrakcije rasla je s povećanjem udjela HBD-a. Zatim je primjetno da su se veće masene koncentracije apigenin-7-*O*-glukozida u ekstraktu dobile s najvećom masom kamilice, odnosno s najvećim omjerom suhe tvari i otapala.

5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada provedene su ekstrakcije polifenolnih spojeva iz suhih usitnjenih cvjetova kamilice pomoću etanola kao konvencionalnog otapala te niskotemperaturnih eutektičkih otapala kao zelenih otapala. Istraženi su DES-ovi na bazi kolin-klorida i etilen-glikola te betaina i propilen-glikola u različitim molarnim omjerima. Sadržaj bioaktivnih komponenti određen je farmakopejskim postupcima, UV/VIS spektrofotometrijom. Osim toga, određena je masena koncentracija i apigenin-7-*O*-glukozida, derivata flavona, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Iz rezultata se može zaključiti sljedeće:

- DES ChCl:EG pokazao se boljim sredstvom za ekstrakciju fenolnih kiselina od DES-a B:PG. Pritom su se u većini slučajeva bolji rezultati dobili su se povećanjem HBD-a u DES-u. Najveće koncentracije fenolnih kiselina u ekstraktu dobile su se najvećom masom kamilice, odnosno s najvećim omjerom suhe tvari i otapala.
- Etanol se pokazao nešto lošijim otapalom od ChCl:EG 1:5 u kojem je ekstrahirana najveća masa kamilice, no isto tako i vrlo dobrim otapalom uzimajući u obzir to da je etanolom ekstrahirana relativno mala masa suhe tvari od oko 0,3 g.
- DES B:PG pokazao se boljim sredstvom za ekstrakciju flavonoida od DES-a ChCl:EG. Kod tog DES-a bolji rezultati dobili su se s povećanjem udjela HBD-a, a najveće koncentracije flavonoida u ekstraktu dobile su se s najvećom masom kamilice, odnosno s najvećim omjerom suhe tvari i otapala.
- Kod primjene DES-a S ChCl:EG za ekstrakciju flavonoida bolji rezultati dobili su se sa smanjenjem udjela HBD-a, a veće koncentracije flavonoida u ekstraktu dobivene su s najmanjom masom kamilice, odnosno s najmanjim omjerom suhe tvari i otapala.
- Etanol se pokazao nešto lošijim ekstrakcijskim sredstvom od najboljeg DES-a B:PG, ali je u razini s većinom ostalih DES-ova.
- Kod ekstrakcije treslovina uočene su znatno veće oscilacije rezultata u odnosu na ekstrakciju fenolnih kiselina i flavonoida što se može pripisati nepovoljnim interakcijama nekih od DES-ova s treslovinama u kamilici.

- Kao najbolja ekstrakcijska sredstva za treslovine znatno se izdvajaju DES-ovi B:PG 1:5 i ChCl:EG 1:5. Kod većine slučajeva dobiveni su bolji rezultati nego s etanolom.
- Kod istraživanja ekstrakcijskog kapaciteta uočava se smanjenje sadržaja bioaktivnih komponenti u ekstraktima s povećanjem broja ekstrakcijskih stupnjeva. Pritom je to smanjenje brže kod flavonoida nego kod fenolnih kiselina. To se može interpretirati nestabilnošću ekstrahiranih tvari, ali potvrditi tek dodatnim eksperimentima.
- Kod ekstrakcije aktivne flavonoidne komponente apigenin-7-*O*-glukozida, DES ChCl:EG pokazao se boljim od DES-a B:PG. Nadalje, bolji rezultati dobili su se s povećanjem udjela HBD-a te s povećanjem mase kamilice, odnosno s povećanjem omjera suhe tvari i otapala.

Dobiveni rezultati u svakom slučaju nude novi pogled na mogućnost ekstrakcije bioaktivnih komponenti niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Dodatna prednost je smanjena potrošnja energije tijekom odvajanja otapala od ekstrahiranih komponenti. Daljnja istraživanja u ovom području mogu biti od velike koristi kako za ljudsko zdravlje tako i za okoliš.

6. POPIS OZNAKA

B – betain (engl. *betaine*)

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

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

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

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

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

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

MeOH – metanol (engl. *methanol*)

PG – propilen-glikol (engl. *propylene glycol*)

UV/VIS – ultravioletna/vidljiva

7. LITERATURA

OPĆA LITERATURA

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.

OSTALA LITERATURA

1. Banožić, M., Matić, M., Šafranko, S., Cikoš, A., Jakovljević, M., Molnar, M., Jokić, S., Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz duhanskog otpada primjenom eutektičkih otapala, *Kemija u industriji* 69(13) (2020) P1-P10, <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.010>.
2. Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti, *Kemija u industriji* 70(9-10) (2021) 551-562, <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>
3. Perković, M., Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2019.
4. Matus, I., Organska i anorganska nevodena otapala, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb, 2016.
5. National Institute for Occupational Safety and Health, <https://www.cdc.gov/niosh/topics/organsolv/default.html>, pristup 14.11.2023.
6. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>, pristup 14.11.2023.
7. Zagajski Kučan, K., Niskotemperaturna eutektična otapala za ekstrakciju sumporovih i dušikovih spojeva iz ugljikovodičnih smjesa, doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
8. United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Marketing Service (AMS), <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Choline%20TR.pdf>, pristup 14.11.2023.

9. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on Safety and Efficacy of Choline Chloride as a Feed Additive for all Animal Species, *EFSA Journal* 9(9) (2011) 2353, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2353>, pristup 14.11.2023.
10. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0760102_EN.htm, pristup 14.11.2023.
11. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB7852707_EN.htm, pristup 14.11.2023.
12. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB8485612_EN.htm, pristup 14.11.2023.
13. Srivastava, J. K., Shankar, E., Gupta, S., Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular Medicine Reports* 3(6) (2010) 895-901, <https://doi.org/10.3892/mmr.2010.377>.
14. Robbins R. J., Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10) (2003) 2866-2887, <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
15. Vermerris, W., Nicholson, R., Phenolic Compounds and Their Effects on Human Health, u Vermerris, W., Nicholson, R. (ur.), *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, Dordrecht, Nizozemska, 2006, str. 235-255, https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_7.
16. Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., Jaremko, M., Important flavonoids and their role as a therapeutic agent, *Molecules* 25(22) (2020) 5243, <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>.
17. Vicente, A. R., Manganaris, G. A., Ortiz, C. M., Sozzi, G. O., Crisosto, C. H., Nutritional Quality of Fruits and Vegetables, u Florkowski, W. J., Shewfelt, R. L., Brueckner, B., Prussia, S. E. (ur.), *Postharvest Handling, A Systems Approach*, 3rd edition, Academic Press Elsevier, Cambridge, Massachusetts, SAD, 2014, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374112-7.00005-6>.
18. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine* 20(7) (1996) 933-956, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
19. Singh, A. K., Singla, R. K., Pandey, A. K., Chlorogenic acid: A dietary phenolic acid with promising pharmacotherapeutic potential, *Current Medicinal Chemistry* 30(34) (2023) 3905-3926, <https://doi.org/10.2174/0929867329666220816154634>.

20. Ratnavathi, C. V., Grain Structure, Quality, and Nutrition, u Aruna, C., Visarada, K. B. R. S., Venkatesh Bhat, B., Tonapi, V. A. (ur.), Breeding Sorghum for Diverse End Uses, Woodhead Publishing Elsevier, Sawston, Cambridge, 2019, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101879-8.00012-7>.
21. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M., Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, UK, 2012.
22. <https://www.examine.com/supplements/apigenin/>, pristup 22.11.2023.
23. <https://www.medicinalplants-pharmacognosy.com/pharmacognosy-s-topics/tannins/>, pristup 14.11.2023.
24. Catani, M. V., Rinaldi, F., Tullio, V., Gasperi, V., Savini, I., Comparative analysis of phenolic composition of six commercially available chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extracts: Potential biological implications, International Journal of Molecular Sciences 22(19) (2021) 10601, <https://doi.org/10.3390/ijms221910601>.