

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz smilja niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Draganjac, Melani

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:149:059288>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Melani Draganjac

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
Studij: KEMIJSKO INŽENJERSTVO;
modul: KEMIJSKO PROCESNO INŽENJERSTVO

Melani Draganjac

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ SMILJA NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marko Rogošić

Članovi povjerenstva:

prof. dr. sc. Marko Rogošić

dr. sc. Kristina Zagajski Kučan

doc. dr. sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, veljača 2024.

EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ SMILJA NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Sažetak

Cilj ovog rada je bilo primijeniti niskotemperaturna eutektička otapala, tzv. „zelena otapala“ za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz smilja kao zamjenu za konvencionalna organska otapala, koja mogu biti štetna i za okoliš i za ljude. Ispitivani su DES-ovi na bazi kolin-klorida (ChCl) i etilen-glikola (EG) te betaina (B) i etilen-glikola (EG). Za obje vrste DES-ova istraženi su molarni omjeri HBA:HBD 1:3, 1:4 i 1:5. Ekstrahirani su polifenolni spojevi: fenolne kiseline, flavonoidi i treslovine iz smilja. Smilje, (lat. *Helichrysum italicum*) je vrijedna ljekovita biljka koja je među širom populacijom najpoznatija po svojoj sposobnosti za regeneraciju kože i prisutna je u mnogim kozmetičkim proizvodima luksuznih brendova kao i u industriji parfema zbog svojeg karakterističnog mirisa. Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva provedeno je prema postupcima iz Europske farmakopeje, UV/VIS spektrofotometrijom. Za fenolne kiseline i flavonoide određen je ekstrakcijski kapacitet procesom višestupanjske ekstrakcije. Nadalje, određena je koncentracija cikorijske kiseline, derivata kafeinske kiseline, u različitim ekstraktima cvijeta smilja metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *high-performance liquid chromatography*). Na temelju eksperimentalnih podataka o ekstrakciji fenolnih kiselina najboljim se pokazao DES B:EG 1:5 s najvećom dodanom masom suhe tvari smilja. Najlošijim se pokazao B:EG 1:3 s najmanjom dodanom masom suhe tvari smilja. Za određivanje flavonoida najboljim se pokazao B:EG 1:3 s najvećom masom, a najlošijim ChCl:EG 1:5 s najvećom masom smilja. Za određivanje sadržaja treslovina najboljim se prikazao ChCl:EG 1:4 s najmanjom masom smilja, a najlošijim ChCl:EG 1:3 s najvećom masom. Zbog prevelikih oscilacija sadržaja treslovina, ekstrakcijski kapacitet određivao se samo za fenolne kiseline i flavonoide. Zaključeno je da je ravnotežni ekstrakcijski kapacitet postignut u 1. stupnju i za fenolne kiseline i flavonoide. Osim toga, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti određena je koncentracija cikorijske kiseline. Najveću koncentraciju imao je uzorak ChCl:EG 1:5 s najvećom masom, a najmanju ChCl:EG 1:4 s najmanjom masom suhe tvari smilja.

Ključne riječi: konvencionalna organska otapala, DES, zelena otapala, fenolne kiseline, flavonoidi, treslovine, HPLC, cikorijska kiselina

EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM IMMORTELLE BY DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Summary

The aim of this work was to apply deep eutectic solvents, "green solvents", for the extraction of bioactive components from immortelle as a substitute for conventional organic solvents, which may be harmful to both the environment and humans. DESs based on choline chloride (ChCl) and ethylene glycol (EG) and betaine (B) and ethylene glycol (EG) were tested. HBA:HBD molar ratios of 1:3, 1:4 and 1:5 were used for both types of DESs. Polyphenolic compounds were extracted: phenolic acids, flavonoids and tannins from immortelle. Immortelle (lat. *Helichrysum italicum*) is a valuable medicinal plant that is best known among the wider population for its ability to regenerate the skin and is present in many cosmetic products of high-end brands as well as in the perfume industry due to its characteristic smell. The determination of the content of polyphenolic compounds was carried out according to the procedures of the European Pharmacopoeia, by UV/VIS spectrophotometry. For phenolic acids and flavonoids, the extraction capacity was determined by a multi-stage extraction process. Furthermore, the concentration of chicory acid, a derivative of caffeic acid, in different immortelle flower extracts was determined using the high performance liquid chromatography (HPLC) method. Based on the experimental data on the extraction of phenolic acids, DES B:EG 1:5 with the highest added mass of immortelle dry matter proved to be the best. B:EG 1:3 proved to be the worst, with the smallest added mass of immortelle dry matter. For the determination of flavonoids, B:EG 1:3 with the largest mass was the best, and ChCl:EG 1:5 with the largest mass of immortelle was the worst. ChCl:EG 1:4 with the smallest mass of immortelle was the best, and ChCl:EG 1:3 with the largest mass was the worst. Due to excessive fluctuations in the content of tannins, the extraction capacity was determined only for phenolic acids and flavonoids. It was concluded that the equilibrium extraction capacity was reached in the 1st stage for both phenolic acids and flavonoids. In addition, the concentration of chicory acid was determined by high-performance liquid chromatography. The sample ChCl:EG 1:5 with the highest mass had the highest concentration, and ChCl:EG 1:4 with the lowest mass of immortelle dry matter had the lowest concentration.

Keywords: conventional organic solvents, DES, green solvents, phenolic acids, flavonoids, tannins, HPLC, chicory acid

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Sastav, svojstva i primjena smilja	3
2.2. Polifenolni spojevi	4
2.2.1. Fenolne kiseline	5
2.2.2. Flavonoidi.....	5
2.2.3. Treslovine	6
2.3. Organska otapala.....	7
2.3.1. Etanol	7
2.4. Niskotemperaturna eutektička otapala.....	8
2.4.1. Betain.....	9
2.4.2. Kolin-klorid	10
2.4.3. Etilen-glikol.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Biljni materijal	12
3.2. Kemikalije i instrumenti.....	12
3.3. Određivanje sadržaja polifenola u organskim otapalima.....	13
3.3.1. Određivanje fenolnih kiselina	13
3.3.2. Određivanje flavonoida.....	13
3.3.3. Određivanje treslovina	14
3.4. Priprava DES-a	15
3.5. Priprava ekstrakta	17
3.6. Određivanje sadržaja polifenola u pripremljenim ekstraktima.....	18
3.6.1. Određivanje fenolnih kiselina	18
3.6.2. Određivanje flavonoida.....	18
3.6.3. Određivanje treslovina	19
3.7. Višestupanjska ekstrakcija – određivanje ekstrakcijskog kapaciteta	20
3.8. Određivanje koncentracije cikorijske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	20
4.1. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja polifenola u organskim otapalima	22
4.1.1. Rezultati određivanja fenolnih kiselina	22
4.1.2. Rezultati određivanja flavonoida.....	22
4.1.3. Rezultati određivanja treslovina	23

4.2. Rezultati preliminarnih ispitivanja u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	23
4.3. Rezultati određivanja sadržaja polifenola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	25
<i>4.3.1. Rezultati određivanja fenolnih kiselina</i>	<i>25</i>
<i>4.3.2. Rezultati određivanja flavonoida</i>	<i>27</i>
<i>4.3.3. Rezultati određivanja treslovina</i>	<i>29</i>
4.4. Rezultati višestupanjske ekstrakcije – određivanje ekstrakcijskog kapaciteta 30	
<i>4.4.1. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u DES-ovima B:EG 1:5 i ChCl:EG 1:5</i>	<i>30</i>
<i>4.4.2. Rezultati određivanja flavonoida u B:EG 1:3 i ChCl:EG 1:3</i>	<i>32</i>
4.5. Karakterizacija polifenolnih sastavnica HPLC-om.....	33
<i>4.5.1. Standardi i kromatogrami</i>	<i>33</i>
<i>4.5.2. Baždarni dijagram</i>	<i>36</i>
<i>4.5.3. Rezultati određivanja cikorijske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u različitim ekstraktima cvijeta smilja</i>	<i>37</i>
5. ZAKLJUČAK	49
6. POPIS OZNAKA	50
7. LITERATURA	51
8. PRILOZI.....	55

1. UVOD

U posljednjih 20 godina brojna istraživanja fokusirala su se na razvoj inovativnih otapala kao održivih zamjena za opasna, otrovna i ekološki štetna otapala.¹ Konvencionalna otapala kao što su metanol, etanol, etil-acetat, hlapljive su i zapaljive organske tvari koje mogu štetiti okolišu. Zamjena za konvencionalna otapala su niskotemperaturna eutektička otapala. Niskotemperaturna eutektička otapala (DES, engl. *deep eutectic solvents*) kao „zelena otapala“ prvi puta spominju Abbott i suradnici 2003.²

DES je otapalo općenito sastavljeno od dvije ili tri jeftine i neškodljive komponente koje su sposobne za uzajamne interakcije, često putem vodikovih veza, kako bi formirale eutektičku smjesu s točkom taljenja nižom od točke taljenja idealne otopine istog sastava. DES-ovi su općenito u kapljevitom stanju pri temperaturama nižim od 100 °C. DES-ovi pokazuju slična fizikalno-kemijska svojstva kao i nešto ranije istraživane ionske kapljevine, no prednost im je to što su jeftiniji i ekološki prihvatljiviji.³

Osim navedenih fizikalno-kemijskih svojstava, mogućnost velikog broja različitih kombinacija ključna je značajka DES-a. Ta karakteristika otvorila je nove perspektive za primjenu navedenih otapala jer je omogućila njihov dizajn u velikim razmjerima, po niskoj cijeni i prihvatljivim svojstvima s obzirom na toksičnost, biorazgradivost i biokompatibilnost.⁴ Zbog mogućih prednosti nad ostalim otapalima, DES-ovi se sve češće istražuju u mnogim područjima.³

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala pokriva nekoliko područja, od ekstrakcije prirodnih proizvoda, elektrokemije, sinteze nanočestica do pročišćavanja biodizela.⁵ U ovom radu istražuju se niskotemperaturna eutektička otapala kao sredstva za ekstrakciju biokomponenti iz smilja.

Smilje (lat. *Helichrysum italicum*) je vrijedna ljekovita biljka koja je među širom populacijom najpoznatija po svojoj sposobnosti za regeneraciju kože i prisutna je u mnogim kozmetičkim proizvodima luksuznih brendova kao i u industriji parfema zbog svojega karakterističnog mirisa.⁶ Također, brojna istraživanja posvećena su ispitivanju njegovih svojstava potencijalno blagotvornih za ljudsko zdravlje. Kao rezultat toga, dokazano je njegovo snažno protuupalno, antioksidativno, antimikrobno i antivirusno djelovanje. Mnoge su industrije povećale potražnju za *H. italicum* što je potaknulo nova istraživanja na tu temu.⁷

U ovom radu kvantitativno je određen sadržaj ukupnih polifenolnih spojeva, fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina u usitnjenom cvijetu smilja. Uspoređene su jednostupanjske

ekstrakcijske djelotvornosti konvencionalnog otapala i niskotemperaturnih eutektičkih otapala za fenolne kiseline i flavonoide. Također, uspoređene su višestupanjske ekstrakcijske djelotvornosti istraženih DES-ova za fenolne kiseline i flavonoide. Konvencionalna otapala su 50 %-tni i 70 %-tni etanol te etil-acetat, a istražena niskotemperaturna eutektička otapala su kolin-klorid : etilen-glikol (ChCl:EG) i betain : etilen-glikol (B:EG), u molarnim omjerima 1:3, 1:4 i 1:5. Kolin-klorid i betain su akceptori vodikove veze (HBA), a etilen-glikol je donor vodikove veze (HBD). Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti određena je koncentracija cikorijske kiseline u različitim ekstraktima cvijeta smilja.

2. OPĆI DIO

Razvoj zelenih otapala niske toksičnosti i cijene ključno je pitanje za farmaceutsku industriju. Danas se konvencionalna organska otapala, npr. metanol, alkoholi, kloroform i etil-acetat, naširoko upotrebljavaju za ekstrakciju bioaktivnih prirodnih spojeva iz biljnog materijala. Međutim, potrošnja velikih količina tih hlapljivih organskih otapala može pridonijeti onečišćenju okoliša i ostaviti neprihvatljive ostatke otapala u ekstraktima. Otkako su ih Abbott i sur.² predstavili 2003., DES-ovi se ubrzano pojavljuju kao nova vrsta ekoloških i održivih otapala. Pripremaju se jednostavnim miješanjem dviju ili više prirodnih, jeftinih i biorazgradivih komponenti kako bi se dobila eutektička smjesa. Dostupnost, niska cijena, biorazgradivost i prihvatljivost za okoliš čine DES-ove svestranom alternativom konvencionalnim organskim otapalima. Zbog svojih izvrsnih svojstava, DES-ovi se široko upotrebljavaju u pripravi nanomaterijala⁸, pri ekstrakciji DNA⁹ i odsumporavanju produkata goriva¹⁰. Također, DES-ovi su svoju primjenu našli i za ekstrakciju i odvajanje bioaktivnih fenolnih spojeva, saponina ili flavonoida iz biljnih materijala. Unatoč tome, broj publikacija o primjeni DES-ova za ekstrakciju aktivnih tvari iz prirodnih proizvoda nije prevelik, a učinkovitost DES-ova pri ekstrakciji drugih vrsta aktivnih prirodnih spojeva (npr. alkaloida, antrakina) još uvijek nije poznata. Prema dostupnim podacima, još uvijek nije provedena sveobuhvatna procjena potencijala i učinkovitosti DES-ova kao zelenih otapala za ekstrakciju različitih bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora.^{5,11}

2.1. Sastav, svojstva i primjena smilja

Smilje (lat. *Helichrysum italicum*), prikazano na *Slici 2.1*, jedna je od najpoznatijih ljekovitih biljaka iz područja Sredozemlja. Snažan miris smilja podsjeća na miris curryja, a u kombinaciji s dugotrajnom svijetložutom bojom cvjetnih glavica čini biljku pravom ikonom mediteranskog područja.¹² Od cvjetova, poznatih kao vječno zlato, još u antici izrađivali su se vijenci. U prirodi raste u različitim i fragmentiranim staništima u suhim i pjeskovito-stjenovitim područjima mediteranskih regija^{13,14} te je stoga dobro prilagođeno surovim i suhim uvjetima okoliša.



Slika 2.1 Cvjetovi smilja

Visoka vrijednost *H. italicum* pripisuje se kemijskim spojevima poput acetofenona, flavonoida, terpenoida i derivata floroglucinola prisutnih u njegovu eteričnom ulju i raznim biljnim ekstraktima.¹⁵

U ekstraktima *H. italicum* prisutne su različite skupine fenolnih spojeva, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi i pironi. Od fenolnih kiselina najčešće su klorogenska, kafeinska, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina. Flavonoidi su otkriveni u glikozidnom i u slobodnom aglikonskom obliku, poput slobodnih aglikona apigenina, naringenina, kemferola i njihovih glikozida. Zabilježeni su i drugi flavonoidi kao što su kvercetin, tilirozid, gafaliin, luteolin.¹⁶

A. Mari i sur.¹² identificirali su nuklearnom magnetskom rezonancijskom (NMR) spektroskopijom spojeve poput kafeinske kiseline, klorogenske kiseline, kvercetin-3-*O*-glukozida, 5-*O*-kafeoil-4-metilkininske kiseline, kemferol-3-*O*-glukozida, izoramnetin-3-*O*-glukozida, 4,5-dikafeoilkininske kiseline, kvercetin-3'-*O*-glukozida, metilnoga estera 3,5-dikafeoilkininske kiseline, tilirozida, 9,12-hidroksitremetona... Od navedenih tvari klorogenska se kiselina u smilju nalazi se najvećem udjelu.

Zbog raznih spojeva, smilje djeluje protuupalno, antivirusno, antikancerogeno¹⁵, antimikrobno¹⁷, a zbog prisutnosti flavonoida u ekstraktima i oni djeluju antioksidativno.¹⁸ U aromaterapiji eterično ulje dobiveno iz smilja primjenjuje se za zacjeljivanje rana i drugih kožnih stanja poput hematoma i ožiljaka.¹⁹ Osim toga, *H. italicum* često se upotrebljava za smirivanje kašlja, pomaže pri iskašljavanju bronhijalne sluzi i ublažava alergijske upale sluznice nosa.

2.2. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi su bioaktivne tvari prisutne u biljkama, voću i povrću. Trenutna klasifikacija dijeli široku kategoriju fenola na polifenole i jednostavne fenole, isključivo na temelju broja prisutnih fenolnih podjedinica.

Polifenoli koji posjeduju najmanje dvije fenolne podjedinice uključuju flavonoide, a oni spojevi koji posjeduju tri ili više fenolnih podjedinica također su podskupina flavonoida i uobičajeno se nazivaju treslovine (ili tanini).

Polifenolni spojevi djeluju protuupalno, antivirusno, antibakterijski i antikancerogeno te imaju antioksidativna svojstva.²⁰

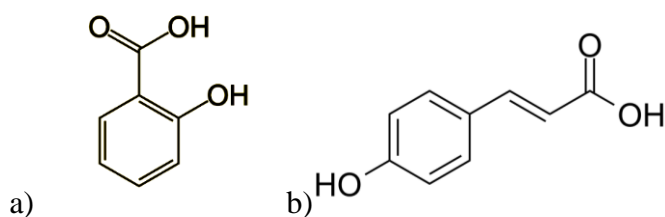
2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline skupina su aromatskih sekundarnih biljnih metabolita široko rasprostranjenih u cijelom biljnom carstvu.²¹ Predmet su brojnih kemijskih, bioloških, poljoprivrednih i medicinskih istraživanja.

Fenolne su kiseline u općem značenju fenolni spojevi s barem jednom karboksilnom skupinom. Međutim, kada se opisuju biljni metaboliti, misli se na zasebnu skupinu organskih kiselina. Prirodne fenolne kiseline izvode se iz dviju različitih ugljikovih struktura: hidroksicimetne (Slika 2.2a) i hidroksibenzojeve strukture (Slika 2.2b).

Među brojnim derivatima hidroksibenzojeve kiseline najpoznatiji su benzojeva, salicilna, vanilinska, galna i protokatehinska kiselina, a među derivatima hidroksicimetne kiseline su cimetna, kafeinska, *o*-kumarinska, *p*-kumarinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Vjerojatno najpoznatija hidroksicimetna kiselina je klorogenska kiselina.

Fenolne kiseline nisu homogeno raspoređene u biljnim tkivima. Osim toga, njihov udio znatno varira tijekom različitih faza sazrijevanja. Poznato je da uvjeti uzgoja, poput temperature, također utječu na sadržaj fenolnih kiselina.²⁰



Slika 2.2 Strukturne formule fenolnih kiselina: a) hidroksibenzojeva kiselina, b) hidroksicimetna kiselina

2.2.2. Flavonoidi

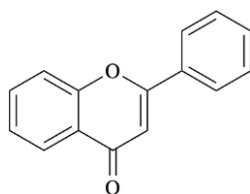
Najveća skupina polifenolnih spojeva su flavonoidi (Slika 2.3).²² Prisutni u većini biljnih tkiva, često u vakuolama, flavonoidi se mogu pojaviti kao monomeri, dimeri i viši oligomeri. Također

se nalaze kao mješavine obojenih oligomernih/polimernih komponenti u raznim vrstama srži i kore.²³

Flavonoidi su nutritivno važni jer su jaki antioksidansi, kao i većina fenolnih spojeva. Poznato je da se mnoge bolesti pogoršavaju u prisutnosti slobodnih radikala poput superoksidnog i hidroksilnog, a flavonoidi imaju sposobnost čišćenja organizma od tih štetnih oksidirajućih vrsta. Stoga se hrana bogata flavonoidima smatra važnom u ublažavanju srčanih bolesti i raka. Kvercetin, flavonoid prisutan u mnogim namirnicama, snažan je antioksidans.²²

Skupine flavonoida poput flavonola, flavona, kalkona, i aurna određuju boju biljaka. Specifični flavonoidi također mogu djelovati u zaštiti biljaka od UV-B zračenja, što se ponekad pripisuje kempferolu.²³

Flavonoidi su zbog svojeg antivirusnog, antibakterijskog, protuupalnog, antidijabetskog i antikancerogenog djelovanja predmet brojnih istraživanja.²⁴

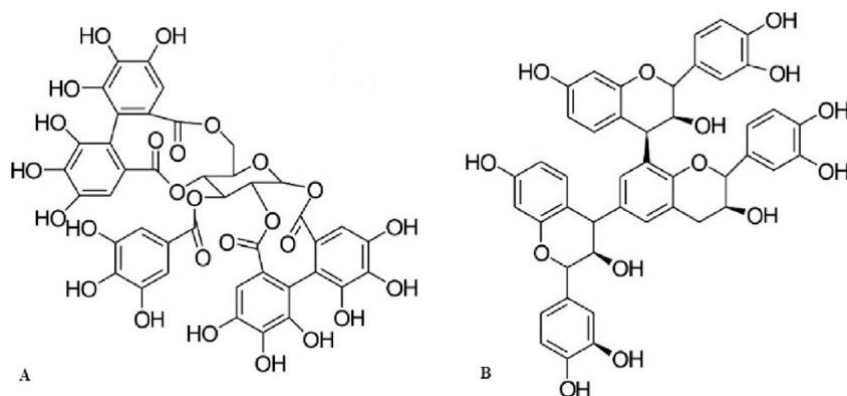


Slika 2.3 Opća strukturalna formula flavonoida

2.2.3. Treslovine

Osim flavonoida, gorčinu u biljkama i hrani biljnog porijekla daju i tanini ili treslovine. Ta skupina uključuje polifenolne spojeve topive u vodi, ponekad velike molekulske mase.

Općenito se dijele u dvije skupine. Prva su tanini koji se mogu hidrolizirati (*Slika 2.4a*) i nastaju esterifikacijom šećera (npr. glukoze) s jednostavnim fenolnim kiselinama koje su izvedene iz soli šikiminske kiseline (npr. galna kiselina). Druga su tanini koji se ne mogu hidrolizirati (*Slika 2.4b*), ponekad se nazivaju kondenziranim taninima i nastaju reakcijama polimerizacije (kondenzacije) flavonoida. Hidroliza prve skupine do jednostavnih kiselina i šećera odvija se djelovanjem baza. Ključna značajka tanina je njihova sposobnost vezanja na proteine, a upotrebljavaju se za štavljenje kože, bistrenje piva i kao adstringentni pripravci u farmaciji.²²



Slika 2.4 Strukturne formule treslovina ili tanina: a) koji se mogu hidrolizirati,
b) koji se ne mogu hidrolizirati

Istraživanje tradicionalne uporabe treslovina omogućilo je njihovo daljnje modificiranje radi industrijske primjene. Međutim, takvo modificiranje podrazumijevalo je dodavanje štetnih tvari kao što je formaldehid koji se klasificira kao kancerogen. Stoga trenutno i znanost i industrija traže zamjenu za takve štetne mješavine, kombiniranjem tanina iz različitih, prirodnih i obnovljivih izvora te neškodljivih aditiva.

Polifenolna priroda tanina otkriva ih kao važan izvor terapijskih molekula. Mnoga su istraživanja pokazala da različiti tanini, primijenjeni na razne načine, čak i kao dodatci prehrani, pokazuju antioksidativno, antimikrobno, antivirusno i protuupalno djelovanje.²⁵

2.3. Organska otapala

Za ekstrakciju, separaciju i pročišćavanje kemikalija potrebna su organska otapala različite polarnosti. Među najčešćim nalaze se alkoholi, kloroform i etil-acetat.²⁶ Međutim, mnoga od tih su zapaljive tvari, štetne za okoliš ili ljudsko zdravlje. To ih je stavilo u središte pozornosti propisa koji ograničavaju ili sprečavaju njihovu upotrebu, primjerice klasificirajući neke od njih kao kancerogene ili toksične za reprodukciju. Zbog toga kemijska industrija sve više traži alternativna, „zelena otapala“ koja nude veću zaštitu ljudima i okolišu i manje su opasna, kako bi se upotrebljavala sigurnije i izbjegla ograničenja koja nameću različiti važeći zakoni.

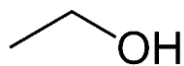
Najčešće primjenjivano konvencionalno organsko otapalo za ekstrakciju je etanol.²⁷

2.3.1. Etanol

Etanol (*Slika 2.5*) je organska tvar formule C_2H_5OH ili CH_3CH_2OH , molekulske mase 46,068 g/mol. Bistra je bezbojna kapljevina karakterističnog vinskog mirisa i oporog okusa. Vrelište mu iznosi $78,37\text{ }^\circ\text{C}$, talište $-114,1\text{ }^\circ\text{C}$ te gustoća 789 kg/m^3 pri $20\text{ }^\circ\text{C}$. Pare su teže od zraka.²⁸

Dobiva se fermentacijom materijala bogatih šećerom kao što su šećerna repa i žitarice ili se proizvodi hidratacijom etilena.

Iako je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, troši se u velikim količinama jer se lako rafinira do visoke čistoće te ima nisku cijenu.²⁷



Slika 2.5 Strukturna formula etanola

Selektivnost otapala za ekstrakciju ciljanog spoja iz biljnog materijala povezana je s kompatibilnošću polarnosti otapala i spoja. Etanol je otapalo koje je sigurno za ljudsku prehranu kao otapalo za prirodne tvari za prehrambene i prirodne medicinske svrhe. Apsolutni (bezvodni) etanol, azeotropni etanol (96 %-tni) i vodeni etanol (< 96 %) uspješno su se upotrebljavali za ekstrakciju fenolnih spojeva iz prirodnih sastojaka. U ekstraktima su identificirani fenoli, flavonoidi, tanini, saponini, alkaloidi, steroide i triterpenoidi.²⁹

Smatralo se da odabir etanola kao ekstrakcijskog otapala daje mnoge prednosti u odnosu na druga organska otapala, primjerice relativno je sigurniji (manje toksičan). U istraživanju koje su provodili N. P. E. Hikmawanti i sur.²⁹ kao ekstrakcijska otapala upotrijebljeni su apsolutni etanol, 70 %-tni etanol i 50 %-tni etanol. Apsolutni etanol sadrži 0,01 % volumena vode. Otapalo 50 %-tni etanol u tom istraživanju uspjelo je ekstrahirati više metabolita iz suhog praha lišća katuka (37,77 %) nego druga otapala etanola (70 %-tni etanol > 96 %-tni etanol). Na polarnost otapala na osnovi etanola utjecala je koncentracija vode. Veći udio vode značio je i veću polarnost u usporedbi s apsolutnim etanolom.³⁰ Otapala s visokom polarnošću mogla su ekstrahirati skupine spojeva u širem rasponu polarnosti. To je omogućilo ekstrahiranje nefenolnih polarnih spojeva kao što su ugljikohidrati i proteini što je rezultiralo povećanim ekstrakcijskim prinosima.³¹

Budući da se 70 %-tni etanol rutinski upotrebljava ekstrakcijsko otapalo, potpuni literaturni pregled bio bi vrlo opsežan. Ovdje će se spomenuti još ekstrakcija fenola i flavonoida iz tropske začinske biljke *Limnophila aromatica*.³²

2.4. Niskotemperaturna eutektička otapala

Zelena tehnologija aktivno traži nova otapala koja bi zamijenila uobičajena organska otapala koja su inherentno toksična i lako hlape u okoliš. Tijekom posljednjih dvaju desetljeća ogromnu pozornost znanstvene zajednice privukle su ionske kapljevine (engl. *ionic liquids*,

IL), a broj objavljenih članaka u literaturi eksponencijalno je porastao. Unatoč tome, “zelenost” IL-a često se dovodi u pitanje, uglavnom zbog njihove slabe biorazgradljivosti, niske biokompatibilnosti i održivosti. Alternativa IL-ima su niskotemperaturna eutektička otapala (DES-ovi). Oni se definiraju se kao mješavine dviju ili više komponenata koje mogu biti krute ili kapljevite i koje pri nekim sastavima imaju talište (znatno) niže od tališta odgovarajuće idealne otopine i stoga su kapljevite na sobnoj temperaturi.⁵

DES-ovi su uobičajeno eutektičke mješavine Lewisovih ili Brønstedovih kiselina i baza i mogu sadržavati različite anionske i/ili kationske vrste.

Ionski DES-ovi uključuju velike, nesimetrične ione niske energije rešetke i stoga niska tališta. Obično se dobivaju kompleksiranjem kvarterne amonijeve soli s metalnom soli ili donorom vodikove veze (HBD).³³

Najčešći DES-ovi temelje se na kolin-kloridu (ChCl), karboksilnim kiselinama i drugim donorima vodikove veze, npr. urei, limunskoj kiselini, jantarnoj kiselini i glicerolu. DES-ovi imaju slične karakteristike kao IL-ovi, ali su jeftiniji (niža cijena sirovina), manje su toksični i često biorazgradivi.³

Do danas je proučavan niz donora vodikovih veza, s niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na osnovi amida, karboksilnih kiselina i alkohola. Takva se otapala jednostavno pripremaju i razmjerno su neosjetljiva na djelovanje vode; mnoga su biorazgradiva i relativno su jeftina.³³

Zbog svoje svestranosti, netoksičnosti i biorazgradljivosti, DES je već pronašao primjenu u biomedicinskom polju. Zabilježeno je da DES može otopiti modelne lijekove, povećavajući topljivost, propusnost i apsorpciju.⁵

Dizajn ekoloških i održivih metoda ekstrakcije prirodnih proizvoda trenutno je vruća tema istraživanja u multidisciplinarnom području primijenjene kemije, biologije i tehnologije.²⁷

U ovom radu istraživat će se ChCl:EG i B:EG zbog svoje netoksičnosti⁴ i dobrih svojstava za ekstrakciju biokomponenta iz biljaka.

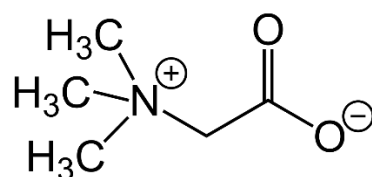
2.4.1. Betain

Betain (*Slika 2.6*) je prirodno prisutan u namirnicama poput repe, špinata i pšeničnog brašna. Međutim, izloženost betainu putem prehrane ne potječe samo od konzumacije hrane koja sadrži betain, već i iz hrane koja sadrži kolin jer se većina kolina u tijelu nepovratno oksidira u betain.

Ukupna izloženost betainu iz unosa hranom izračunata iz zbroja najviših srednjih unosa iz literature može se procijeniti na oko 830 mg/dan.³⁴

DES na bazi betaina obično se opisuje kao kapljeviti sustav visoke viskoznosti, što otežava rukovanje njime. Moguća alternativa za zaobilazanje tog problema je dodavanje vode kao treće komponente za smanjenje viskoznosti.³⁵

DES-ovi na bazi betaina imaju raznoliku primjenu. Istraživanja su pokazala da su dobra otapala za pročišćavanje benzina³⁶, biodizela³⁷, te za ekstrakciju polifenolnih spojeva³⁸.



Slika 2.6 Strukturna formula betaina

2.4.2. Kolin-klorid

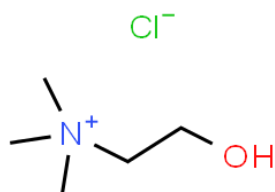
Kolin-klorid (*Slika 2.7*) je bijeli kristalni prah. Molekulska formula kolin-klorida je $C_5H_{14}NO\cdot Cl$, a njegova molarna masa je 139,63 g/mol. Tali se pri 247 °C, topiv je u vodi (800 g/L pri 25 °C) i etanolu, netopiv u eteru i benzenu.³⁹

Kolin-klorid, ChCl, je po svom kemijskom sastavu kvarterna amonijeva sol te je među komercijalno najvažnijim solima N-alkiliranih etanolamina.⁴⁰

Kolin-klorid (ChCl) je najčešće istraživani HBA, koji tvori eutektičke smjese sa širokim rasponom HBD-ova, primjerice s ureom, alkoholima, karboksilnim kiselinama, ugljikohidratima i mnogim drugim spojevima. Kation kolina može se naći uglavnom u višim biljkama, a njegova biosinteza uključuje enzimsku dekarboksilaciju serina u etanolamin nakon koje slijede tri paralelne, međusobno povezane i uzastopne enzimske N-metilacije. Unatoč tome, kolin-klorid se industrijski sintetizira reakcijom klorovodika, etilen-oksida i trimetilamina.

Zanimljivo je da se kolin-klorid u Europi smatra provitaminom koji služi kao dodatak hrani za životinje.³⁸

U mnogim istraživanjima kolin-klorid je glavni HBA. DES-ovi na bazi kolin-klorida koriste se također kao otapala za pročišćavanje biodizela^{37,41}, ekstraktivnu denitrifikaciju, desulfurizaciju, dearomatizaciju motornih goriva⁴² te ekstrakciju biokomponenti iz biljaka²⁵.



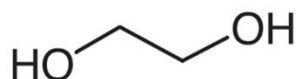
Slika 2.7 Strukturna formula kolin-klorida

2.4.3. Etilen-glikol

Etilen-glikol je organski spoj formule $C_2H_6O_2$ i strukturne formule prikazane na *Slici 2.8*. Molekulska masa iznosi 62,07 g/mol, a gustoća 1,11 g/cm³. Vrelište etilen-glikola iznosi 197,3 °C, a talište -12,9 °C.⁴³

Etilen-glikol (EG) je organsko otapalo bez mirisa i boje koje se upotrebljava u industriji prirodnog plina kao sredstvo za uklanjanje vode. u sustavu grijanja i hlađenja kao antifriz, te u industriji tkanina, plastike i boja. Nadalje, etilen-glikol se primjenjuje u sintezi nanočestica kontroliranog oblika i kao elektrooksidans u gorivim ćelijama. Vezano uz posljednju primjenu, nedostaci EG-a su loša elektrokemijska stabilnost, stvaranje intermedijarnih kemikalija i visoka potrošnja energije.⁴⁴

Etilen-glikol u DES-ovima ponaša se kao HBD. Kako je već navedeno, DES-ovi na bazi kolin-klorida i etilen-glikola te betaina i etilen-glikola istraženi su za pročišćavanje biodizela, ekstrakciju polifenolnih spojeva, te za ekstrakciju DNA⁹.



Slika 2.8 Strukturna formula etilen-glikola

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj eksperimenata provedenih u ovom radu bio je usporediti djelotvornost ekstrakcije organskim otapalom, etanolom (za fenolne kiseline) te etil-acetatom (za flavonoide), s djelotvornošću ekstrakcije niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (DES-ovima) te pronaći „zeleno otapalo“ koje će zamijeniti štetna organska otapala kod ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz smilja. Eksperimenti su se provodili na sobnoj temperaturi te pri atmosferskom tlaku. Dio eksperimenata proveden je u laboratorijima Zavoda za fizikalnu kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, a dio u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal sastojao se od samljevenih i osušenih cvjetova smilja. Biljni materijal prikupljen je 2022. u Bosni i Hercegovini, na terenskoj nastavi prikupljanja biljaka Zavoda za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Cijeli cvjetovi skladišteni su u tamnom, suhom prostoru te su mljeveni po potrebi i čuvani u malim papirnatim vrećama.

3.2. Kemikalije i instrumenti

Za provedbu eksperimenata u upotrijebljene su sljedeće kemikalije i reagensi: 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), heksametilen-tetramin (Kemika), cikorijska kiselina, standard (Sigma-Aldrich), kloridna 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).

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

3.3. Određivanje sadržaja polifenola u organskim otapalima

U ovom radu određeni su maseni udjeli fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina, flavonoida te ukupnih polifenola i treslovina. Sadržaj navedenih bioaktivnih komponenti određivao se spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku.⁴⁵

3.3.1. *Određivanje fenolnih kiselina*

Za dobivanje ekstrakta potrebno je suhi biljni materijal usitniti u prah te 0,300 g praškasto usitnjenog uzorka ekstrahirati s 95 mL 50 %-tnog etanola zagrijavanjem 30 min u tikvici u kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja i filtriranja, filtrat u odmjerne tikvici treba razrijediti 50 %-tnim etanolom do 100,0 mL.

Nadalje, 1,0 mL dobivenog ekstrakta potrebno je prebaciti u odmjernu tikvicu od 10 mL te dodati redom: 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdatnog reagensa te 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida. Tikvicu zatim treba dopuniti vodom do oznake.

Za poredbenu otopinu, 1,0 mL ekstrakta potrebno je pomiješati s 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline i 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida te razrijediti destiliranom vodom do 10,0 mL.

Nakon provedenih koraka potrebno je odmah izmjeriti apsorbanciju ispitivane otopine na 525 nm u odnosu na poredbenu otopinu.

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

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5,3}{m} \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 525 nm, a m je masa droge u gramima, uzevši u obzir da specifična apsorbancija klorogenske kiseline na 525 nm iznosi 188.

Određivanje se provodi u triplicatu.

3.3.2. *Određivanje flavonoida*

Za dobivanje ekstrakta potrebno je suhi biljni materijal usitniti u prah te 0,600 g staviti u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Zatim treba dodati 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina u vodi, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline masene koncentracije 250 g/L. Sadržaj u tikvici potrebno je zagrijavati 30 min na kipućoj vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Zagrijani sadržaj treba filtrirati preko malo pamuka, a ostatke droge u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) ponovno ekstrahirati dvaput s po 20 mL acetona, zagrijavanjem 10 min. Nakon hlađenja,

sjedinjene filtrate treba filtrirati preko filter-papira uz ispiranje tikvice i filter-papira te otopinu razrijediti acetonom do 100,0 mL. Nadalje, 20,0 mL acetonskog ekstrakta treba prenijeti u lijevku za odjeljivanje i pomiješati s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku treba izmućkati s 15 mL etil-acetata, a zatim triput s po 10 mL etil-acetata. Sjedinjene etil-acetatne ekstrakte treba dodatno isprati u lijevku za odjeljivanje dvaput s po 50 mL vode. Naposljetku, etil-acetatne ekstrakte treba filtrirati preko 10 grama bezvodnog natrijeva sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i razrijediti etil-acetatom do oznake.

Za ispitivanu otopinu potrebno je 10,0 mL dobivenog etil-acetatnog ekstrakta prebaciti u odmjernu tikvicu od 25 mL, dodati 1,0 mL reagensa aluminijskog klorida te razrijediti s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake.

Za poredbenu otopinu potrebno je 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta razrijediti do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline.

Nakon 30 min potrebno je izmjeriti apsorbanciju ispitivane otopine na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu.

Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m} \quad (2)$$

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a m je masa droge u gramima, uzevši u obzir da specifična apsorbancija izokvercetrozida na 425 nm iznosi 500.

Određivanje se provodi u triplikatu.

3.3.3. Određivanje treslovina

Za ekstrakt potrebno je suhi biljni materijal usitniti u prah te 1,000 g droge prelići u tikvici okruglog dna od 250 mL s 150 mL vode i ekstrahirati 30 min na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja pod tekućom vodom, dobiveni ekstrakt treba kvantitativno (uz ispiranje okrugle tikvice vodom) prenijeti u odmjernu tikvicu i razrijediti vodom do 250,0 mL te pustiti da se čestice istalože. Ekstrakt nakon toga treba profiltrirati preko filter-papira, a prvih 50 mL filtrata treba baciti.

Za određivanje ukupnih polifenola potrebno je 5,0 mL filtrata razrijediti vodom do 25,0 mL. Nadalje, 2,0 mL te otopine potrebno je pomiješati s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL. Sadržaj tikvice potrebno je nadopuniti vodenom

otopinom natrijeva karbonata (290 g/L) do oznake. Nakon 30 min potrebno je izmjeriti apsorbanciju na 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu.

Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak, odnosno netaninskih polifenola, potrebno je u 10,0 mL filtrata dodati 0,10 grama kožnog praška. Sadržaj tikvice treba snažno mućkati 60 min na laboratorijskoj tresilici. Nakon 60 min sadržaj je potrebno filtrirati, a 5,0 mL dobivenog filtrata razrijediti vodom do 25,0 mL. Nadalje, 2,0 mL te otopine treba pomiješati u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode. Sadržaj tikvice treba nadopuniti do oznake vodenom otopinom natrijeva karbonata (290 g/L). Nakon 30 min treba izmjeriti apsorbanciju na 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu.

Za dobivanje standarda potrebno je otopiti 50,0 mg pirogalola u vodi u odmjernoj tikvici od 100,0 mL, a 5,0 mL dobivene otopine razrijediti vodom do 100,0 mL. Nadalje, 2 mL te otopine treba pomiješati u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 10,0 mL vode te sadržaj tikvice nadopuniti do oznake vodenom otopinom natrijeva karbonata (290 g/L). Nakon 30 min potrebno je izmjeriti apsorbanciju na 760 nm, uz vodu kao poredbenu otopinu.

Postotni udio treslovina, izražen kao pirogalol, izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ treslovina} = 62,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1} \quad (3)$$

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

Određivanje se provodi u triplikatu.

3.4. Priprava DES-a

Za pripravu niskotemperaturnih eutektičkih otapala upotrijebljene su organske komponente: betain (B), etilen-glikol (EG) i kolin-klorid (ChCl) osušene pri 60 °C kroz 6 h u vakuum sušioniku radi njihove higrofnosti. Primijenjeni molarni omjeri zadanih DES-ova B:EG i ChCl:EG su 1:3, 1:4 i 1:5. Potrebna masa komponenti za određeni sastav niskotemperaturnih eutektičkih otapala izračunata je preko zadanog molarnog omjera tako da pripravljenog DES-a bude otprilike 150 mL. Donori vodikove veze (HBD) pomiješani su s akceptorima vodikovih veza (HBA) tako da su navedene komponente izvagane izravno u tikvice s okruglim dnom i brušenim čepom i miješane na magnetnoj miješalici pri temperaturi oko 100 °C te 900 o/min do nastanka homogene smjese.

DES-ovi betain : etilen-glikol (B:EG) i kolin-klorid : etilen-glikol (ChCl:EG) izabrani su na temelju preliminarnih rezultata, jer se se među ispitivanim DES-ovima pokazali najboljima za ekstrakciju fenolnih kiselina iz smilja.

U *Tablici 3.1* prikazani su upotrijebljeni DES-ovi i volumen otapala te masa suhe biljne tvari, odnosno smilja koja je miješana s otapalom.

Tablica 3.1 Prikaz istraženih DES-ova, volumena DES-ova i mase suhe biljne tvari

DES	V(otapala)/mL	m(suhe biljne tvari)/g
ChCl:EG 1:3	18	0,5
ChCl:EG 1:3	18	1,0
ChCl:EG 1:3	18	1,79
ChCl:EG 1:4	18	0,5
ChCl:EG 1:4	18	1,0
ChCl:EG 1:4	18	1,71
ChCl:EG 1:5	18	0,5
ChCl:EG 1:5	18	1,0
ChCl:EG 1:5	18	1,5
B:EG 1:3	18	0,5
B:EG 1:3	18	1,0
B:EG 1:3	18	1,5
B:EG 1:4	18	0,5
B:EG 1:4	18	1,0
B:EG 1:4	18	1,5
B:EG 1:5	18	0,5
B:EG 1:5	18	1,0
B:EG 1:5	18	1,5

Preliminarnim ispitivanjima dobiveno je da je optimalan volumen otapala 18 mL te da najveća masa koja se može pomiješati s DES-om da se dobije dovoljno ekstrakta za daljnja ispitivanja iznosi 1,79 g u ChCl:EG 1:3. DES B:EG puno je viskozniji od ChCl:EG te je za taj DES upotrijebljena manja masa suhe biljne tvari.

3.5. Priprava ekstrakta

Samljeveni biljni prah cvjetova smilja najprije je izvagan na analitičkoj vagi te je odabrana masa suhe biljne tvari pomiješana u staklenoj bočici s čepom s 18 mL otapala. Dobivena otopina miješana je na magnetskoj miješalici 30 min pri sobnoj temperaturi i 900 rpm. Nakon miješanja dobivene suspenzije prebačene su kapalicama u kivete i centrifugirane u laboratorijskoj centrifugi oko dvije minute pri 3500 rpm. Bistre centrifugirane otopine iznad taloga prebačene su u laboratorijske bočice od 10 mL.

Mase 0,5 g, 1,0 g i 1,5 g te 18 mL DES-a odabrane su radi čim manje potrošnje kemikalija te na osnovi maksimalne potrošnje ekstrakata tokom određivanja polifenola.

3.6. Određivanje sadržaja polifenola u pripremljenim ekstraktima

Za određivanje fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina u DES-ovima poslužili su raspoloživi propisi za određivanje sadržaja polifenola u organskim otapalima, koji su modificirani radi manje potrošnje kemikalija te zbog faznog stanja ispitivane tvari. Kao polazni materijal za određivanje polifenola u organskim otapalima služi suha biljna tvar, a za određivanje polifenola u DES-ovima pripremljeni kapljevit ekstrakt. Zbog velikog broja eksperimenata i 18 različitih ekstrakata smanjene su količine po ekstraktu radi smanjenja potrošne kemikalija i suhe biljne tvari. Osnovni propisi navedeni su u odjeljcima 3.3.1., 3.3.2. i 3.3.3.

3.6.1. Određivanje fenolnih kiselina

Kod određivanja fenolnih kiselina za ispitivanu i poredbenu otopinu upotrijebljene su odmjerne tikvice od 5 mL, a ne 10 mL. Sukladno navedenom, sve količine reagensa i ekstrakata dvostruko su umanjene.

Za ispitivanu otopinu potrebno je 0,5 mL ekstrakta dobivenog prema postupku navedenom u 3.5. prebaciti u odmjernu tikvicu od 5 mL te u odmjernu tikvicu dodati redom: 1,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 1,0 mL nitrit-molibdatnog reagensa te 1,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida. Sadržaj tikvice potom je potrebno nadopuniti vodom do oznake.

Za poredbenu otopinu, potrebno je 0,5 mL ekstrakta pomiješati s 1,0 mL 0,5 M kloridne kiseline i 1,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida te razrijediti destiliranom vodom do 5,0 mL.

Potrebno je izmjeriti apsorbanciju ispitivane otopine na 525 nm u odnosu na poredbenu otopinu.

Zbog navedenih promjena, maseni udio fenolnih kiselina izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 0,96}{m} \quad (4)$$

gdje je m odvaga 1 mL ekstrakta DES-a ili suhe biljne tvari, ovisno o istraživanom supstratu.

3.6.2. Određivanje flavonoida

Za određivanje flavonoida sve vrijednosti su peterostruko umanjene.

Za ispitivanu otopinu potrebno je 2,0 mL dobivenog ekstrakta prebaciti u odmjernu tikvicu od 5 mL, dodati 0,2 mL reagensa aluminijskog klorida te razrijediti s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake.

Za poredbenu otopinu potrebno je 2,0 mL ekstrakta razrijediti do 5,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline.

Nakon 30 min potrebno je izmjeriti apsorbanciju ispitivane otopine na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu.

Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 0,09}{m} \quad (5)$$

gdje je m odvaga 2 mL ekstrakta DES-a ili suhe biljne tvari, ovisno o istraživanom supstratu.

3.6.3. Određivanje treslovina

Za određivanje ukupnih polifenola 0,5 mL ekstrakta potrebno je pomiješati s 0,2 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 2,0 mL vode u odmjerne tikvici od 5 mL. Sadržaj tikvice potrebno je nadopuniti otopinom natrijeva karbonata (290 g/L) do oznake. Nakon 30 min potrebno je izmjeriti apsorbanciju na 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu.

Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak, odnosno netaninskih polifenola, potrebno je u 2,0 mL ekstrakta dodati 0,02 grama kožnog praška. Sadržaj tikvice snažno treba mućkati 60 min na laboratorijskoj tresilici. Nakon 60 min sadržaj tikvice potrebno je filtrirati, a 2,0 mL dobivenog filtrata razrijediti vodom do 5,0 mL. Nadalje, 0,5 mL te otopine treba pomiješati u odmjerne tikvici od 5 mL s 0,2 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i 2,0 mL vode. Sadržaj tikvice treba nadopuniti do oznake vodenom otopinom natrijeva karbonata (290 g/L). Nakon 30 min treba izmjeriti apsorbanciju na 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu.

Postotni udio treslovina, izražen kao pirogalol, izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ treslovina} = 12,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1} \quad (6)$$

Gdje je m_1 odvaga 0,5 mL ekstrakta DES-a ili suhe biljne tvari, ovisno o istraživanom supstratu, m_2 je masa pirogalola, A_1 apsorbancija ukupnih polifenola, A_2 apsorbancija netaninskih polifenola, a A_3 apsorbancija pirogalola.

Kod određivanja fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina navedene ispitivane i poredbene otopine trebalo je profiltrirati kroz Büchnerov lijevak kako ne bi došlo do замуćenja zbog ostataka biljne tvari u ekstraktima.

3.7. Višestupanjska ekstrakcija – određivanje ekstrakcijskog kapaciteta

Ekstrakcijski kapacitet određuje mogućnost višekratnog korištenja iste šarže ekstrakcijskog otapala bez pročišćavanja. Na taj se način ekstrahirane komponente postupno nakupljaju u otapalu (DES), i u konačnici, nakon postizanja ravnotežne koncentracije, inhibiraju daljnju ekstrakciju.

Određivanje ekstrakcijskog kapaciteta provodilo se za fenolne kiseline i flavonoide. Postupak se provodio tako da se prvotno pripremio ekstrakt postupkom opisanim u odjeljku 3.5. Nakon prvog stupnja dio ekstrakta koji se nije potrošio u mjerenjima izvagao se te mu se dodala odgovarajuća masa suhe biljne tvari tako da omjer volumena otapala i mase suhe biljne tvari bude jednak kao u prvom stupnju.

Višestupanjska ekstrakcija provodila se sve do postizanja stalne koncentracije fenolnih kiselina ili flavonoida. Ekstrakcijski kapacitet određivao se za po jedan DES iz obje istražene skupine, i to onaj koji se pokazao najboljim za ekstrahiranje fenolnih kiselina i flavonoida. Za fenolne kiseline to su bili DES-ovi ChCl-EG 1:5 i B:EG 1:5, a za flavonoide DES-ovi ChCl-EG 1:3 i B:EG 1:3.

3.8. Određivanje koncentracije cikorijske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Cikorijska kiselina ubraja se u derivate kafeinske kiseline i njezina molekulska formula je $C_{22}H_{18}O_{12}$. Topiva je u etanolu, metanolu, dioksanu, acetonu i vrućoj vodi, slabo topiva u etil-acetatu i eteru te netopiva u ligroinu, benzenu i kloroformu.

Cikorijska kiselina je rijedak i vrijedan funkcionalni sastojak hrane bez očigledne ovisnosti o dozi, bez nuspojava predoziranja, bez kontraindikacija i interakcija s lijekovima. Široko se upotrebljava u lijekovima, dodacima prehrani i zdravoj hrani zbog svojih obećavajućih farmakoloških učinaka u regulaciji metabolizma glukoze i lipida: ima protuupalna, antioksidativna i *anti-age* svojstva te je djelotvorna kod bolesti probavnog sustava.⁴⁶

Ispitivani spojevi razdvojeni su na koloni Zorbax Eclipse XDBC18 (250×4,6 mm, 5 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) prema prethodno opisanoj metodi.⁴⁷ Temperatura kolone održavana je na 25 °C. Primijenjena je metoda gradijentnog eluiranja s trima otapalima. Otapalo A bio je acetonitril, otapalo B bila je smjesa vode i octene kiseline u omjeru, 99:1, v/v, a otapalo C bio je metanol. Primijenjen je sljedeći gradijentni program: od 1 % A, 95 % B, 4 % C na 0 min do 5% A, 85% B, 10% C na 15 min, zatim na 15% A, 35% B, 50% C na 45 min, potom na 20% A, 5% B, 75% C na 60 min, u nastavku do 1% A, 95% B, 4% C na 72 min, te

na kraju održavajući 1% A, 95% B, 4% C 3 min (do 75 min). Prije ubrizgavanja, ekstrakti su filtrirani (0,45 µm) i adekvatno razrijeđeni metanolom. Primijenjeni volumni protok bio je 1,0 mL/min. Cikorijska kiselina identificirana je usporedbom vremena zadržavanja i UV-spektra analiziranih ekstrakata i standardne otopine cikorijske kiseline. Prije injektiranja ekstrakti i standard filtrirani su kroz filter veličine pora 0,45 µm.

4.1. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja polifenola u organskim otapalima

4.1.1. Rezultati određivanja fenolnih kiselina

Određivanje derivata hidroksicimetne kiseline temelji se na stvaranju žuto obojenih kompleksa između *o*-hidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatnog reagensa, a žuta boja otopine zalučivanjem prelazi u narančastocrvenu. Dobiveni rezultati prikazani su u *Tablici 4.1*. Maseni udio fenolnih kiselina prikazan je preko klorogenske kiseline. Apsorbancija se mjerila tri puta i uzimala se srednja vrijednost mjerenja. Mjerenje se provodilo pri valnoj duljini od 525 nm, a udio klorogenske kiseline izračunavao se preko specifične apsorbancije koja za klorogensku kiselinu iznosi 188.

Tablica 4.1 Rezultati određivanja fenolnih kiselina u cvijetu smilja (*Helichrysum italicum*)

<i>m</i> _{suhe biljne tvari/g}	<i>A</i>	<i>A</i> _{sr}	<i>w</i> _{fenolnih kiselina/%}
	0,083		
0,3008	0,093	0,090	1,5799
	0,093		

Spektrofotometrijskom metodom određeno je da je etanolom iz 0,3008 g suhe biljne tvari ekstrahirano 1,5799 % fenolnih kiselina, izraženo preko klorogenske kiseline.

4.1.2. Rezultati određivanja flavonoida

Radi određivanja sadržaja flavonoida potrebno je provesti hidrolizu flavonoidnih glikozida, nakon čega se aglikoni odjeljuju izmućkivanjem s etil-acetatom. Dodatkom aluminijeva klorida otopini aglikona nastaju žuto obojeni kompleksni spojevi s maksimumom apsorbancije u vidljivom području pri 425 nm. Sadržaj flavonoida izražava se kao maseni udio izokvercetrozida koji se izračunava pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercetrozid iznosi 500. Apsorbancija je izmjerena tri puta se te uzimala srednja vrijednost dobivenih vrijednosti za proračun masenog udjela flavonoida, odnosno izokvercetrozida. U *Tablici 4.2* prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 4.2 Rezultati određivanja flavonoida u cvijetu smilja (*Helichrysum italicum*)

<i>m</i> _{suhe biljne tvari/g}	<i>A</i>	<i>A</i> _{sr}	<i>w</i> _{flavonoida/%}
	0,024		
0,6007	0,029	0,025	0,0527
	0,023		

Spektrofotometrijskom metodom određeno je da je etil-acetatom iz 0,6007 g suhe biljne tvari ekstrahirano 0,0527 % flavonoida, izraženo preko izokvercetrozida.

4.1.3. Rezultati određivanja treslovina

Princip određivanja temelji se na određivanju ukupnih polifenola u ekstraktu biljne droge prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu treslovine. S Folin-Ciocalteuovim reagensom polifenolne sastavnice formiraju plavo obojene kompleksne spojeve, a apsorbancija nastalih plavih otopina mjeri se na 760 nm. Sadržaj treslovina određen je iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak. Sadržaj treslovina izražen je kao pirogalol. Mjerenja su provedena tri puta i uzeta je srednja vrijednost apsorbancije za daljnja računanja. Rezultati određivanja treslovina prikazani su u *Tablici 4.3*.

Tablica 4.3 Rezultati određivanja treslovina u cvijetu smilja (*Helichrysum italicum*)

	A	A _{sr}	w/%
	0,105		
ukupni polifenoli	0,104	0,105	
	0,105		
polifenoli neadsorbirani na kožni prašak	0,018		
	0,019	0,018	
	0,018		
	0,334		
pirogalol	0,335	0,335	
	0,335		
treslovine			0,8066
$m_{\text{suhe biljne tvari/g}}$	1,0006		
$m_{\text{pirogalola/g}}$	0,05		

Spektrofotometrijskom metodom određeno je da je vodom iz 0,6007 g suhe biljne tvari ekstrahirano 0,8066 % treslovina, izraženo preko pirogalola.

4.2. Rezultati preliminarnih ispitivanja u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Kako bi se odlučilo koja će se niskotemperaturna eutektička otapala (DES-ovi) istraživati u diplomskom radu, provelo se preliminarno ispitivanje s dostupnim DES-ovima. U preliminarnim ispitivanjima određivao se sadržaj fenola u smilju. Upotrebljavalo se 6 mL otapala i 0,2 g suhe biljne tvari. U *Tablici 4.4* prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 4.4 Rezultati preliminarnih ispitivanja

DES	A	A_{sr}	m_{ekstrakta}/g	w_{fenolnih kiselina}/%
betain : mliječna kiselina 1:2	0,031	0,028	0,5005	0,0357
	0,036			
	0,017			
betain : glicerol 1:3	0,133	0,134	0,5783	0,1482
	0,133			
	0,137			
betain : etilen- glikol 1:3	0,438	0,439	0,5197	0,5389
	0,438			
	0,441			
betain : propilen- glikol 1:3	0,162	0,164	0,4907	0,2128
	0,166			
	0,163			
70 %-tni etanol	2,186	2,185	0,5261	2,6497
	2,185			
	2,184			
kolin-klorid : etilen-glikol 1:3	0,448	0,453	0,559	0,5166
	0,456			
	0,454			
kolin-klorid : propilen-glikol 1:4	0,239	0,234	0,4989	0,2997
	0,232			
	0,232			
betain : propilen- glikol 1:4	0,250	0,250	0,5039	0,3170
	0,250			
	0,251			
kolin-klorid : glicerol 1:3	0,249	0,249	0,4877	0,3262
	0,250			
	0,249			
<i>m</i> _{suhe biljne tvari} /g	0,2			
<i>V</i> _{otapala} /mL	6			

Iz dobivenih rezultata vidi se da je 70 %-tni etanol najbolje ekstrakcijsko otapalo. Kako je cilj ovog diplomskog rada zamijeniti konvencionalna otapala, usporedbom dobivenih rezultata

zaključeno je kako su B:EG 1:3 i ChCl:EG 1:3 najbolja alternativna otapala za ekstrakciju fenolnih kiselina. Kako bi se vidjelo kako se ponaša DES s promjenom omjera HBA i HBD, istraživali su se omjeri B:EG 1:4 i B:EG 1:5, ChCl:EG 1:4 i ChCl:EG 1:5. Budući da je u oba niza primijenjen isti HBD, uspoređivat će se kako na ekstrakciju utječe vrsta HBA te primijenjeni omjeri HBA i HBD.

4.3. Rezultati određivanja sadržaja polifenola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

4.3.1. Rezultati određivanja fenolnih kiselina

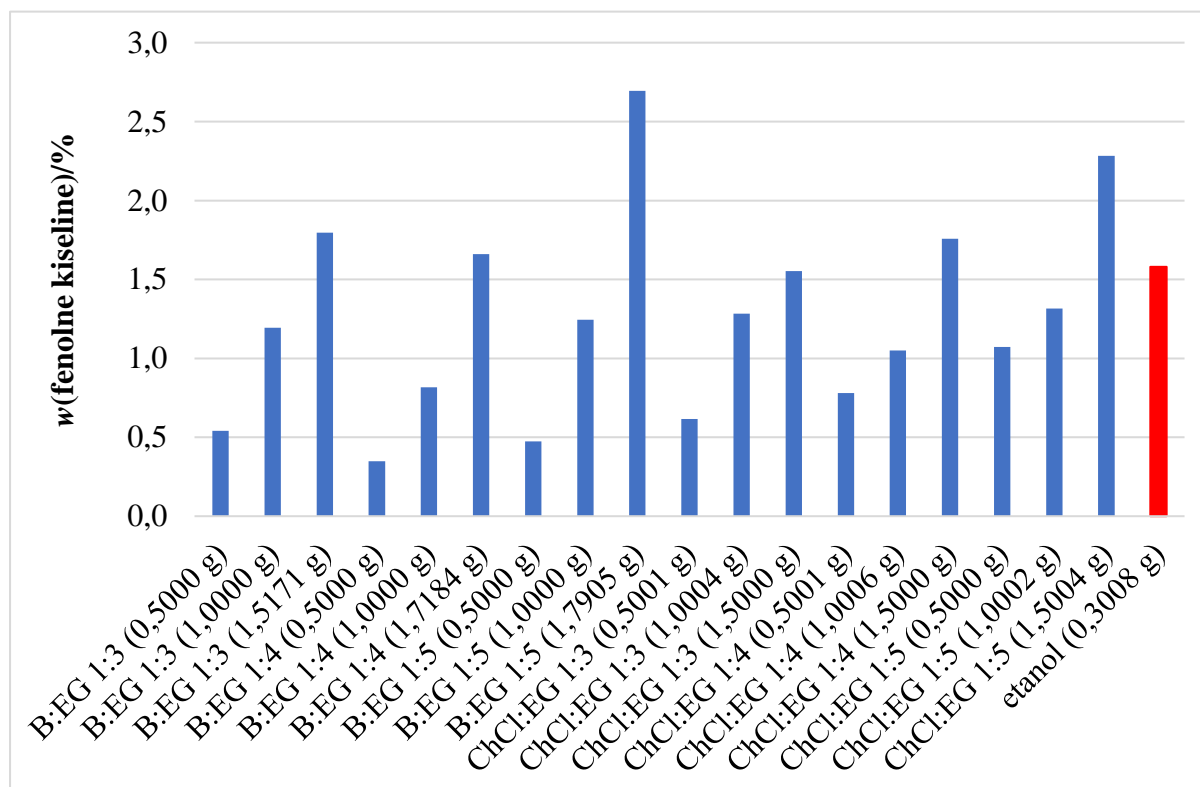
U *Tablici 4.5* prikazani su rezultati dobiveni određivanjem udjela fenolnih kiselina u cvijetu smilja. Mjerenja su provedena za DES-ove B:EG i ChCl:EG u različitim omjerima 1:3, 1:4 i 1:5. Također, za svaki DES istražena su tri različita omjera mase suhe biljne tvari i otapala.

Tablica 4.5 Udjeli fenolnih kiselina u različitim ekstraktima cvijeta smilja

uzorak	$m_{\text{ekstrakta/g}}$	A_{sr}	$W_{\text{fenolnih kiselina/\%}}$
B:EG 1:3 (0,5000 g)	0,6001	0,339	0,5418
B:EG 1:3 (1,0000 g)	0,5185	0,644	1,1930
B:EG 1:3 (1,5171 g)	0,5038	0,943	1,7969
B:EG 1:4 (0,5000 g)	0,5432	0,197	0,3487
B:EG 1:4 (1,0000 g)	0,5583	0,475	0,8173
B:EG 1:4 (1,7184 g)	0,5095	0,881	1,6600
B:EG 1:5 (0,5000 g)	0,5819	0,288	0,4746
B:EG 1:5 (1,0000 g)	0,5733	0,744	1,2453
B:EG 1:5 (1,7905 g)	0,5351	1,502	2,6953
ChCl:EG 1:3 (0,5001 g)	0,5286	0,339	0,6157
ChCl:EG 1:3 (1,0004 g)	0,5591	0,747	1,2821
ChCl:EG 1:3 (1,5000 g)	0,4928	0,797	1,5532
ChCl:EG 1:4 (0,5001 g)	0,5239	0,426	0,7800
ChCl:EG 1:4 (1,0006 g)	0,5357	0,586	1,0507
ChCl:EG 1:4 (1,5000 g)	0,5361	0,981	1,7567
ChCl:EG 1:5 (0,5000 g)	0,5183	0,578	1,0712
ChCl:EG 1:5 (1,0002 g)	0,5258	0,720	1,3152
ChCl:EG 1:5 (1,5004 g)	0,5580	1,327	2,2824

Prema prikazanim rezultatima u *Tablici 4.5* može se zaključiti da ekstrakt s otapalom B:EG 1:5 i najvećom masom suhe biljne tvari sadrži najveći udio fenolnih kiselina. Kod DES-a ChCl:EG

najveći udio sadrži ekstrakt u omjeru 1:5 i najvećom masom suhe biljne tvari. Kod otapala B:EG najmanji udio fenolnih kiselina je u ekstraktu s B:EG 1:4 koji, uspoređujući s ostalim omjerima, ima najmanji udio fenolnih kiselina u svim trima uzorcima. U ekstraktima s DES-om ChCl:EG najmanji udio fenolnih kiselina nalazi se u DES-u ChCl:EG 1:3 s najmanjom masom suhe biljne tvari. Svih šest uzoraka slijedi jednak trend povećanja udjela fenolne kiseline s povećanjem mase suhe tvari koja se nalazi u otapalu. Taj se trend bolje uočava na grafičkom prikazu svih DES-ova te u usporedbi s etanolom na *Slici 4.1*.



Slika 4.1 Sadržaj fenolnih kiselina u različitim ekstraktima cvijeta smilja

Na *Slici 4.1* vidi se da je udio fenolnih kiselina u ekstraktima s DES-ovima veći nego u etanolu. Treba se također uzeti u obzir da je u etanolu masa suhe biljne tvari 0,3008 g. Nadalje, vidi se da veći omjer HBD:HBA daje i veći udio fenolnih kiselina iz čega se može zaključiti da je bolji DES s većim udjelom etilen-glikola.

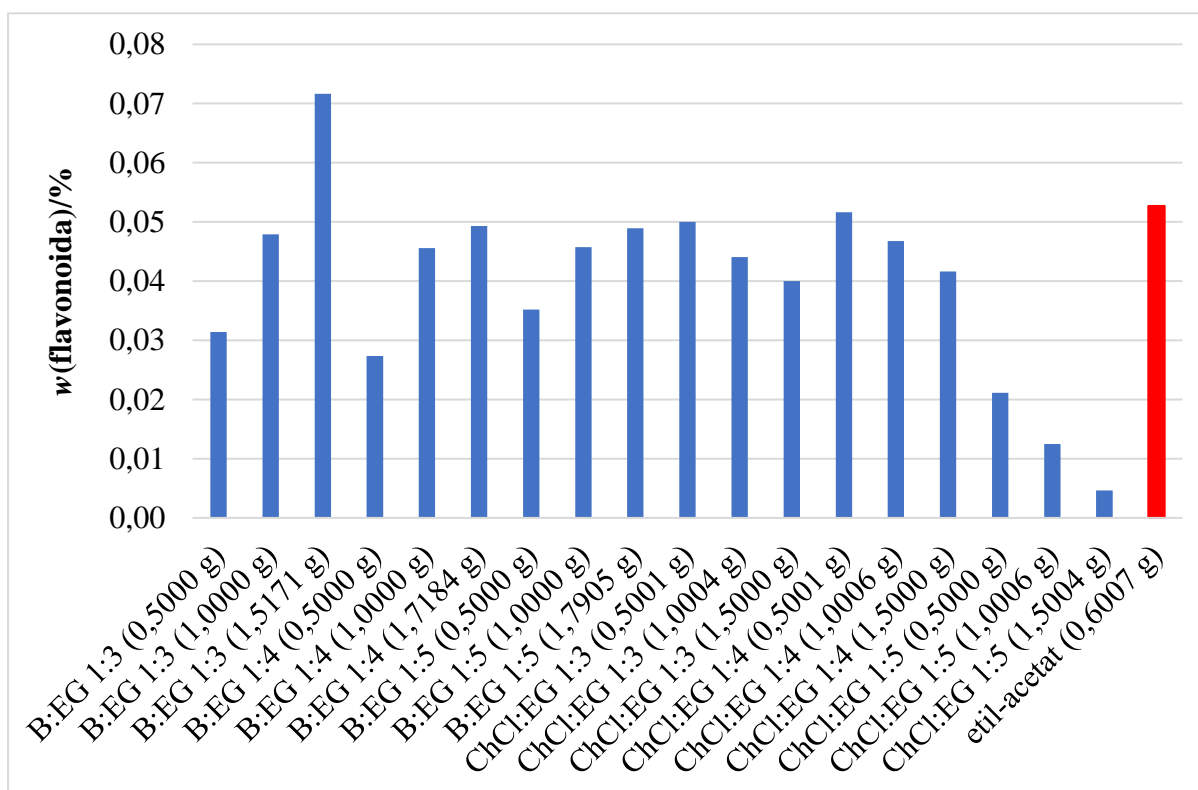
4.3.2. Rezultati određivanja flavonoida

U Tablici 4.6 prikazani su udjeli flavonoida u različitim ekstraktima cvijeta smilja.

Tablica 4.6 Udjeli flavonoida u različitim ekstraktima cvijeta smilja

uzorak	$m_{\text{ekstrakta/g}}$	A_{sr}	$w_{\text{flavonoida/\%}}$
B:EG 1:3 (0,5000 g)	2,0642	0,720	0,0314
B:EG 1:3 (1,0000 g)	2,0866	1,111	0,0479
B:EG 1:3 (1,5171 g)	2,0653	1,644	0,0716
B:EG 1:4 (0,5000 g)	2,0220	0,615	0,0274
B:EG 1:4 (1,0000 g)	2,1072	1,067	0,0456
B:EG 1:4 (1,7184 g)	2,1070	1,155	0,0493
B:EG 1:5 (0,5000 g)	2,1470	0,840	0,0352
B:EG 1:5 (1,0000 g)	2,1053	1,071	0,0457
B:EG 1:5 (1,7905 g)	2,1541	1,171	0,0489
ChCl:EG 1:3 (0,5001 g)	2,0978	1,166	0,0500
ChCl:EG 1:3 (1,0004 g)	2,0810	1,020	0,0441
ChCl:EG 1:3 (1,5000 g)	2,0498	0,912	0,0400
ChCl:EG 1:4 (0,5001 g)	2,1324	1,224	0,0516
ChCl:EG 1:4 (1,0006 g)	2,0749	1,079	0,0468
ChCl:EG 1:4 (1,5000 g)	2,1208	0,981	0,0416
ChCl:EG 1:5 (0,5000 g)	2,2700	0,533	0,0211
ChCl:EG 1:5 (1,0002 g)	2,1698	0,300	0,0125
ChCl:EG 1:5 (1,5004 g)	2,1239	0,110	0,0047

U Tablici 4.6 vidi se da je najveći udio flavonoida u DES-u B:EG 1:3 s najvećom masom suhe biljne tvari, a najmanji za otapalo ChCl:EG 1:5 s najvećom masom suhe biljne tvari. Od DES-ova tipa B:EG najmanji udio flavonoida nalazi se u DES-u B:EG 1:4. Kod ChCl:EG najveći udio flavonoida nalazi se u DES-u ChCl:EG 1:4 s masom biljne tvari 1,0 g. Na *Slici 4.2* grafički je prikazan udio flavonoida u uzorcima.



Slika 4.2 Sadržaj flavonoida u različitim ekstraktima cvijeta smilja

Na Slici 4.2 vidi se da za DES B:EG s povećanjem mase suhe biljne tvari raste udio flavonoida u ekstraktu, dok se za DES ChCl:EG taj udio smanjuje s povećanjem mase suhe biljne tvari. Također, s povećanjem omjera HBD:HBA smanjuje se udio flavonoida i u ekstraktima gdje je otapalo B:EG i gdje je ChCl:EG, što znači da je za ekstrakciju flavonoida pogodnije da je manji udio etilen-glikola. Nadalje, vidi se da kod otapala B:EG s porastom mase suhe biljne tvari raste udio flavonoida i takav trend vrijedi za sva tri sastava DES-a. S druge strane, kod DES-a ChCl:EG s povećanjem mase suhe biljne tvari smanjuje se udio flavonoida i takav trend vrijedi za sva tri sastava DES-a. U usporedbi s etil-acetatom najpogodnije otapalo je B:EG 1:3 uz ekstrakciju iz 1,5171 g smilja. Treba napomenuti da masa smilja, odnosno suhe biljne tvari pri ekstrakciji etil-acetatom iznosi 0,6007 g.

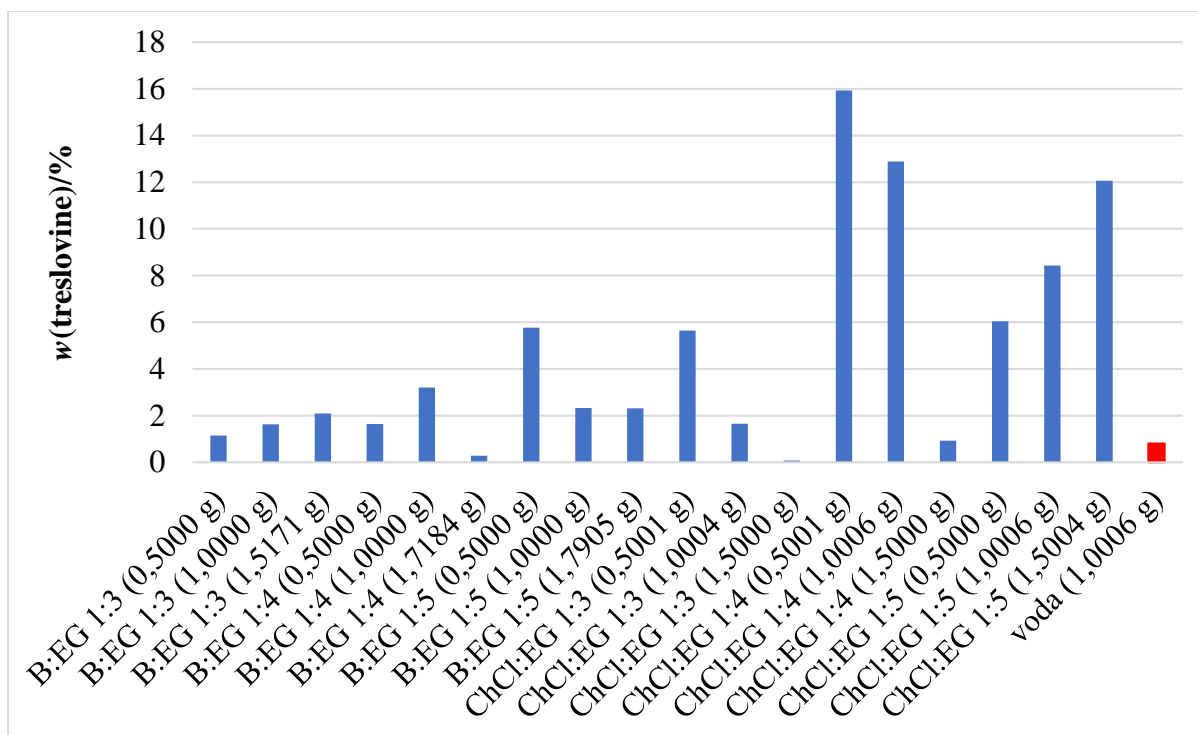
4.3.3. Rezultati određivanja treslovina

U *Tablici 4.7* prikazani su rezultati dobivenim određivanjem treslovina u različitim ekstraktima cvijeta smilja. Kako se udio treslovina računa preko pirogalola, masa pirogalola s kojim se išlo u proračun je 0,05 g, a apsorbancija 0,127.

Tablica 4.7 Udjeli treslovina u različitim ekstraktima cvijeta smilja

uzorak	$m_{\text{kožnog praška/g}}$	$m_{\text{ekstrakta u kožnom prašku/g}}$	$m_{\text{ekstrakta/g}}$	$A_{\text{netaninskih polifenola}}$	$A_{\text{kupnih polifenola}}$	$w_{\text{treslovina/\%}}$
B:EG 1:3 (0,5000 g)	0,0101	0,4184	0,4323	2,413	2,514	1,1498
B:EG 1:3 (1,0000 g)	0,0101	0,4544	0,5161	3,635	3,805	1,6242
B:EG 1:3 (1,5171 g)	0,0108	0,4351	0,4421	4,143	4,331	2,0927
B:EG 1:4 (0,5000 g)	0,0101	0,4152	0,4289	2,330	2,473	1,6408
B:EG 1:4 (1,0000 g)	0,0101	0,4234	0,3901	3,499	3,753	3,2085
B:EG 1:4 (1,7184 g)	0,0104	0,4132	0,4259	4,198	4,222	0,2812
B:EG 1:5 (0,5000 g)	0,0101	0,4159	0,4526	2,534	3,064	5,7629
B:EG 1:5 (1,0000 g)	0,0101	0,4058	0,4283	3,890	4,093	2,3302
B:EG 1:5 (1,7905 g)	0,0107	0,4325	0,4282	4,103	4,304	2,3139
ChCl:EG 1:3 (0,5001 g)	0,0116	0,4805	0,4258	0,244	0,732	5,6440
ChCl:EG 1:3 (1,0004 g)	0,0100	0,4823	0,4327	0,446	0,591	1,6529
ChCl:EG 1:3 (1,5000 g)	0,0120	0,4226	0,3941	0,148	0,155	0,0791
ChCl:EG 1:4 (0,5001 g)	0,0105	0,3815	0,4135	0,654	1,994	15,9361
ChCl:EG 1:4 (1,0006 g)	0,0100	0,5525	0,4208	0,720	1,821	12,8840
ChCl:EG 1:4 (1,5000 g)	0,0101	0,4530	0,4682	0,252	0,340	0,9250
ChCl:EG 1:5 (0,5000 g)	0,0102	0,4554	0,4315	1,618	2,148	6,0447
ChCl:EG 1:5 (1,0002 g)	0,0100	0,4101	0,4220	2,133	2,855	8,4237
ChCl:EG 1:5 (1,5004 g)	0,0109	0,4403	0,4035	1,068	2,057	12,0663

Prema rezultatima iz *Tablice 4.7* može se zaključiti da se najveći udio treslovina nalazi u DES-u ChCl:EG 1:4 s najmanjom masom suhe biljne tvari, a najmanji udio u DES-u ChCl:EG 1:3 s najvećom masom suhe biljne tvari. Za B:EG najviši udio treslovina dobije se s omjerom 1:5 i najmanjom masom, a najmanji s omjerom 1:4 i najvećom masom suhe biljne tvari. Na *Slici 4.3* grafički je prikaz udjela treslovina u različitim ekstraktima cvijeta smilja.



Slika 4.3 Sadržaj treslovina u različitim ekstraktima cvijeta smilja

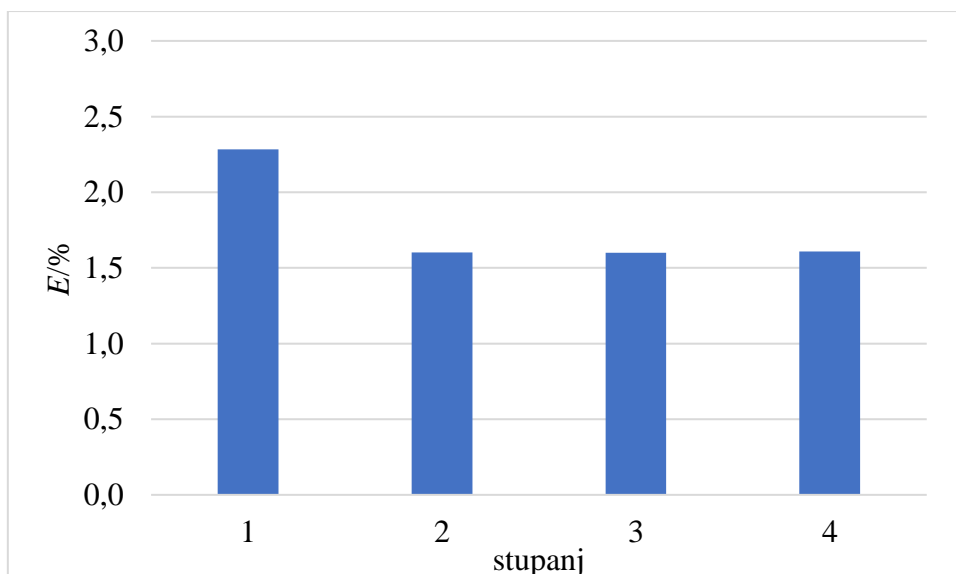
Na *Slici 4.3* ne opaža se jasan trend rasta ili pada kako je to bilo kod fenolnih kiselina i flavonoida. Također, vidi se da je udio treslovina veći u većini ekstrakata s DES-ovima nego u vodenom ekstraktu. Masa suhe biljne tvari u vodi je 1,0006 g. U daljnjim eksperimentima zbog nejasnih trendova više se nije mjerio sadržaj treslovina već samo fenolnih kiselina i flavonoida.

4.4. Rezultati višestupanjske ekstrakcije – određivanje ekstrakcijskog kapaciteta

Kao što je prikazano u rezultatima u poglavlju 4.3, najpogodniji DES-ovi za ekstrakciju fenolnih kiselina su B:EG 1:5 i ChCl:EG 1:5, a za flavonoide B:EG 1:3 i ChCl:EG 1:3. Za daljnja mjerenja izabrani su najpogodniji DES-ovi iz obiju skupina. Mjerenja su provedena s 1,5 grama suhe biljne tvari i 18 mL otapala. Nakon prvog stupnja smanjuje se volumen te se dodaje manja masa prema proračunu tako da prvotni omjer mase smilja i otapala bude isti u svim ekstrakcijskim stupnjevima.

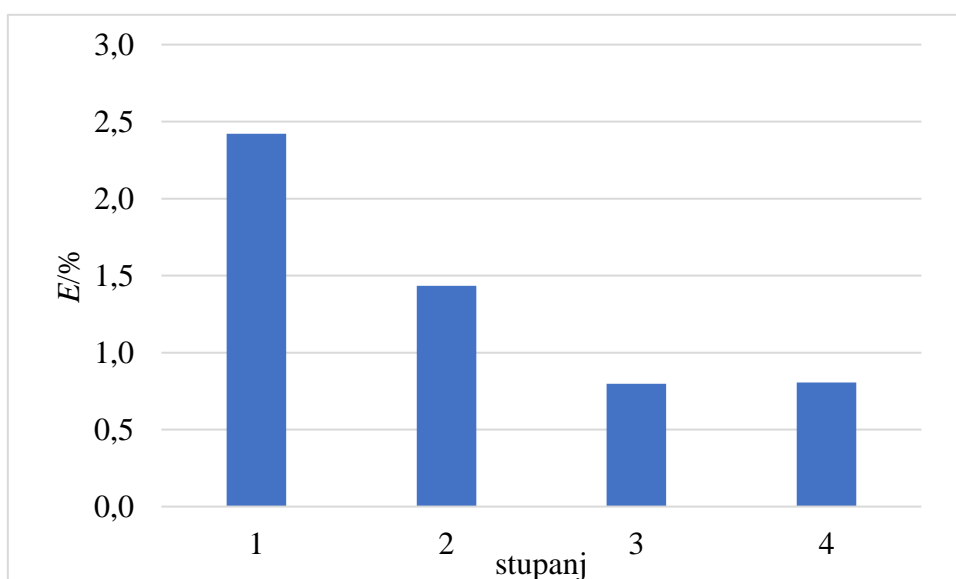
4.4.1. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u DES-ovima B:EG 1:5 i ChCl:EG 1:5

Na *Slikama 4.4* i *4.5* prikazani su rezultati dobiveni za određivanje fenolnih kiselina u ekstraktima na bazi B:EG 1:5 i ChCl:EG 1:5. Ekstrakcija je provedena u četirima ekstrakcijskim stupnjevima.



Slika 4.4 Grafički prikaz ovisnosti ekstrakcijskog kapaciteta izraženog kao sadržaj fenolnih kiselina u ChCl:EG 1:5 o broju ekstrakcijskih stupnjeva

Očekivalo se da će se dodavanjem smilja u već pripravljeni ekstrakt povećati sadržaj fenolnih kiselina u drugom i sljedećim stupnjevima. Iz dobivenih rezultata na *Slici 4.4* vidljivo je upravo suprotno. Može se zaključiti da je ekstrakcijski kapacitet dosegnut već u prvom stupnju.

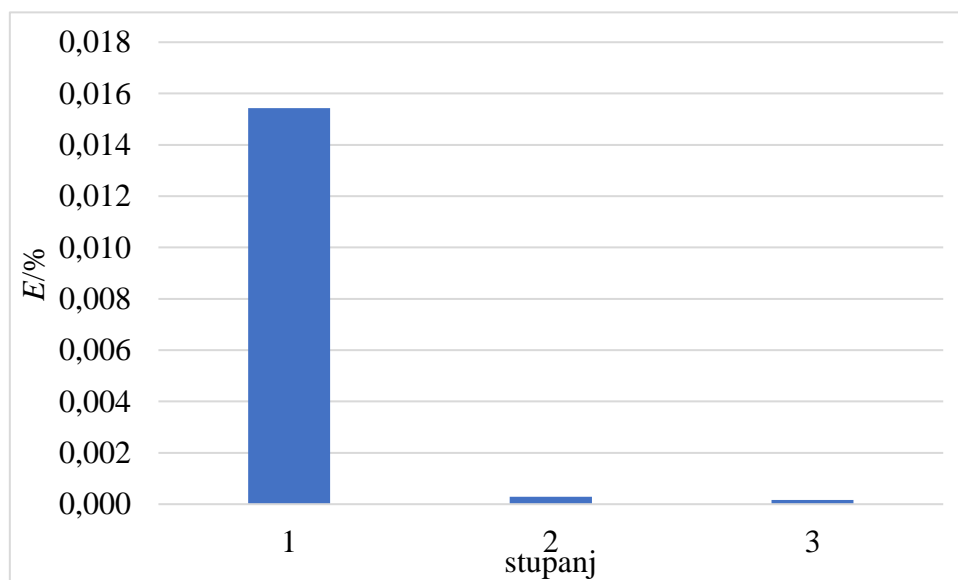


Slika 4.5 Grafički prikaz ovisnosti ekstrakcijskog kapaciteta izraženog kao sadržaj fenolnih kiselina u B:EG 1:5 o broju ekstrakcijskih stupnjeva

Na *Slici 4.5* vidi se da je situacija s ekstraktom na bazi B:EG 1:5 slična kao s onim na osnovi ChCl:EG 1:5. S povećanjem broja stupnjeva smanjuje se sadržaj fenolnih kiselina iz čega se može zaključiti da je ekstrakcijski kapacitet vjerojatno dosegnut već u prvom stupnju. Kako bi se navedeno moglo potvrditi trebalo bi provesti dodatna ispitivanja.

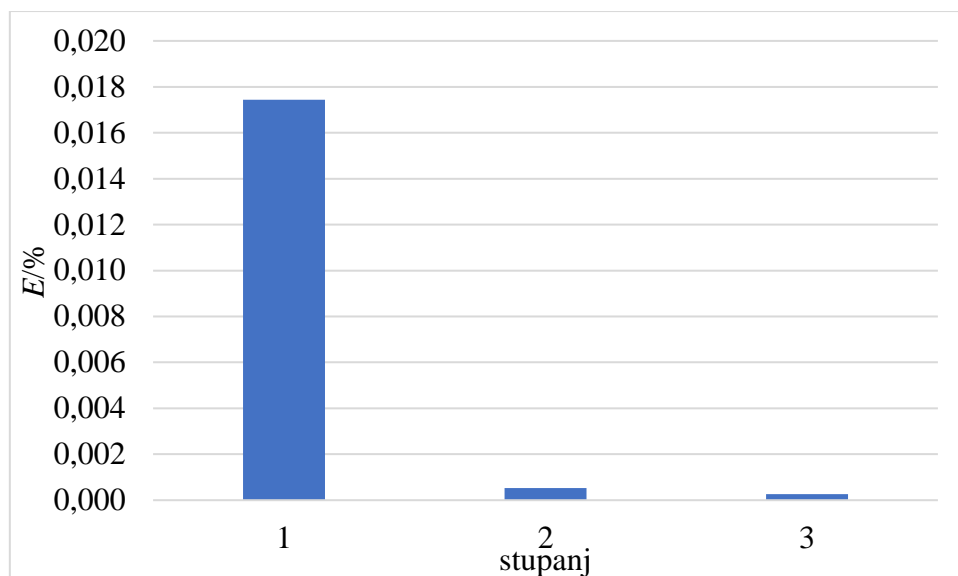
4.4.2. Rezultati određivanja flavonoida u B:EG 1:3 i ChCl:EG 1:3

Nakon određivanja ekstrakcijskog kapaciteta fenolnih kiselina u DES-ovima, na Slikama 4.6 i 4.7 prikazani su rezultati za određivanje ekstrakcijskog kapaciteta flavonoida. Proveden je isti postupak kao i za fenolne kiseline, samo uz primjenu drugih DES-ova (B:EG 1:3 i ChCl:EG 1:3) koji su se pokazali najpogodnijima za određivanje sadržaja flavonoida. Eksperiment je proveden u trima stupnjevima.



Slika 4.6 Grafički prikaz ovisnosti ekstrakcijskog kapaciteta izraženog kao sadržaj flavonoida u ChCl:EG 1:3 o broju ekstrakcijskih stupnjeva

Kod određivanja ekstrakcijskog kapaciteta za flavonoide u ChCl:EG 1:3 dobiveno je još izraženije smanjenje nego kod određivanja fenolnih kiselina. U drugom i trećem stupnju sadržaj fenolnih kiselina skoro je zanemariv. Iz navedenog se može zaključiti da je ekstrakcijski kapacitet dosegnut već u prvom stupnju, a stabilnost flavonoida u istraženom DES-u je vrlo upitna.



Slika 4.7 Grafički prikaz ovisnosti ekstrakcijskog kapaciteta izraženog kao sadržaj flavonoida u B:EG 1:3 o broju ekstrakcijskih stupnjeva

Rezultati s B:EG 1:3 prikazani na Slici 4.7 slični su kao i kod ChCl:EG 1:3; sadržaj flavonoida zanemariv je u drugom i trećem stupnju što znači da je DES pogodan samo za jednostupanjsku ekstrakciju, moguće zbog male stabilnosti ekstrakata.

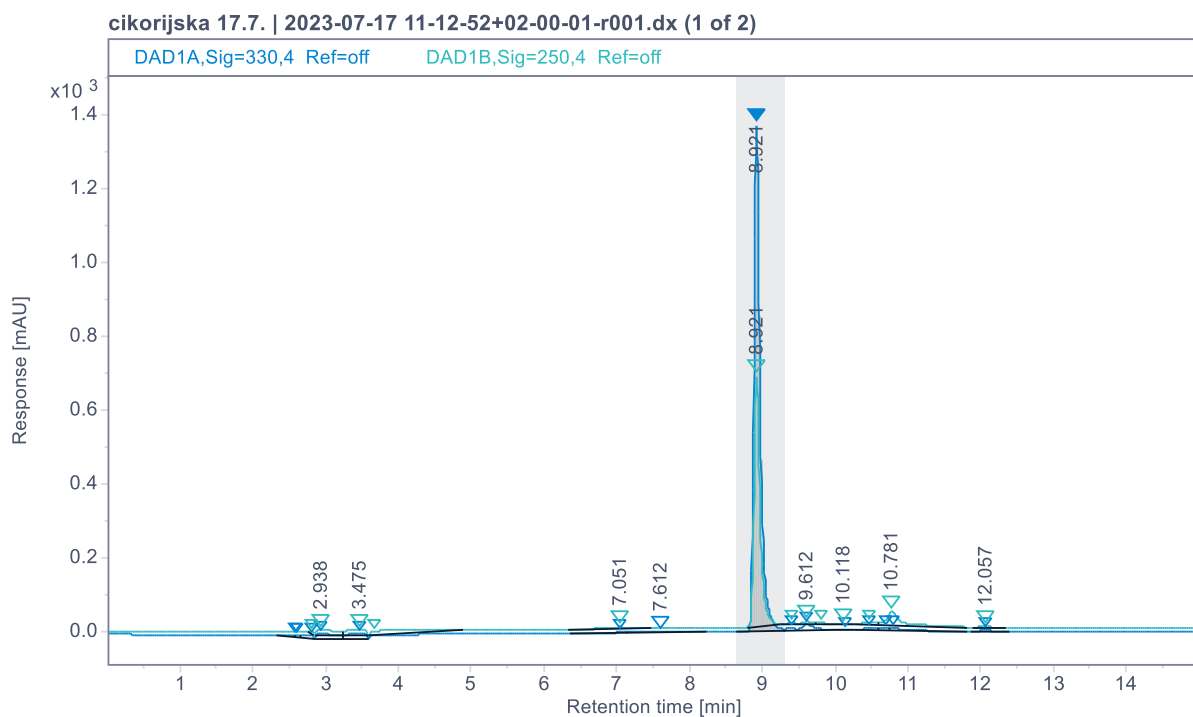
4.5. Karakterizacija polifenolnih sastavnica HPLC-om

Koncentracije cikorijske kiseline u ekstraktima određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

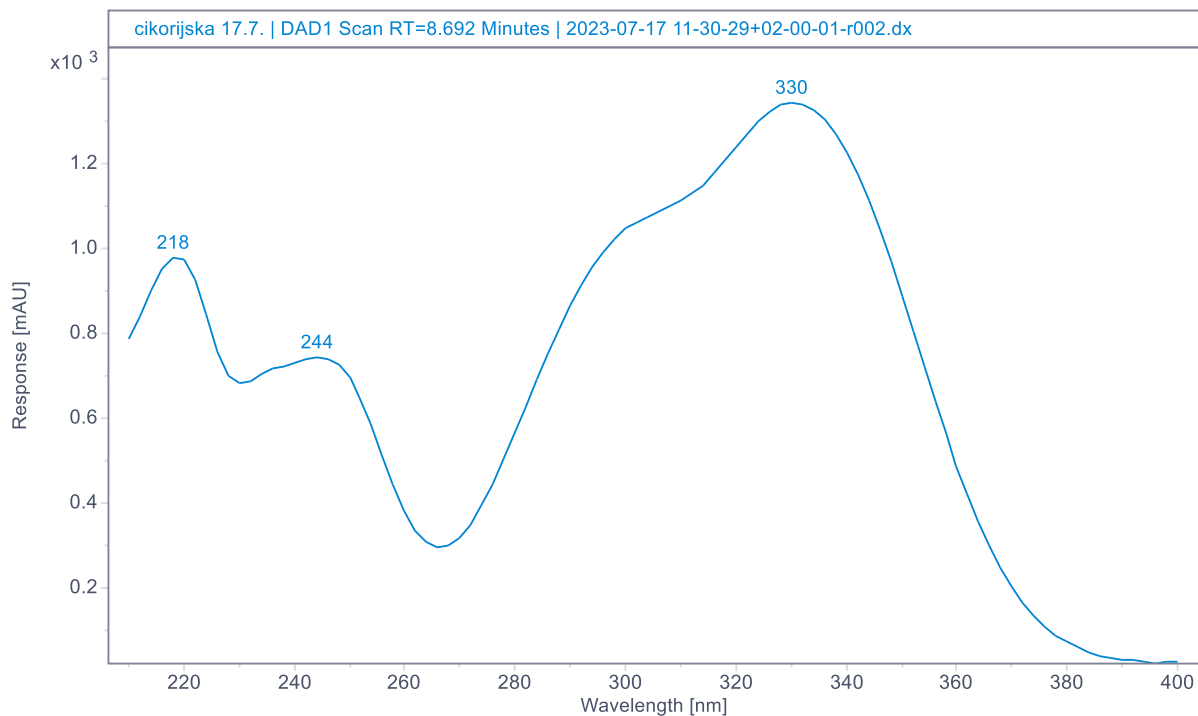
Eksperimenti rezultiraju kromatogramima na kojima se prema retencijskim vremenima lako uočavaju pikovi istraživanog derivata kafeinske kiseline. Međutim, uz retencijska vremena postoje i karakteristični UV-spektri bioaktivnih komponenata koji također ukazuju na prisutnost cikorijske kiseline u ekstraktima. Također, uz cikorijsku kiselinu odredila se i prisutnost klorogenske kiseline, ali se u daljnjem proračunu koncentracija računala samo za cikorijsku kiselinu.

4.5.1. Standardi i kromatogrami

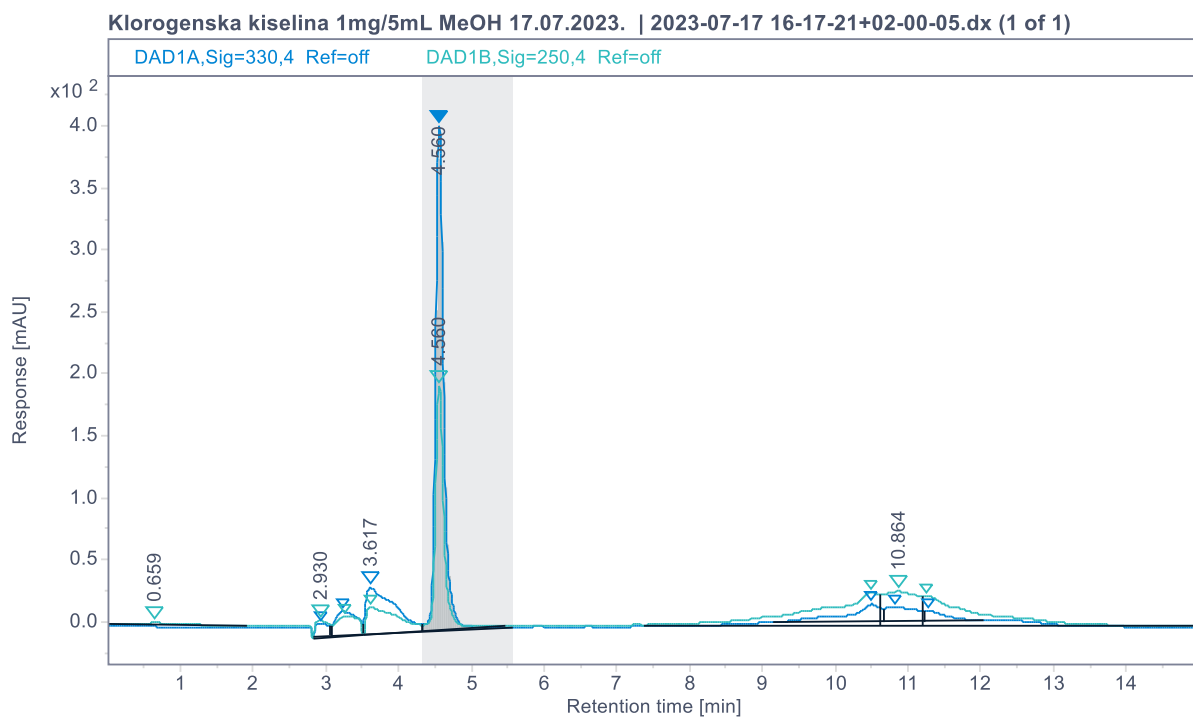
Na *Slikama 4.8 i 4.10* prikazani su kromatogrami standardnih otopina omjera 1 mg /5 mL MeOH gdje su određena retencijska vremena i površine ispod pikova za cikorijsku i klorogensku kiselinu. Na *Slici 4.12* prikazan je kromatogram ekstrakta cvijeta smilja na bazi 70 %-tnog etanola. Također, kako je navedeno prije, uz retencijska vremena postoje i UV-spektri bioaktivnih komponenata koji ukazuju na prisutnost cikorijske kiseline (*Slika 4.9*) i klorogenske kiseline (*Slika 4.11*)



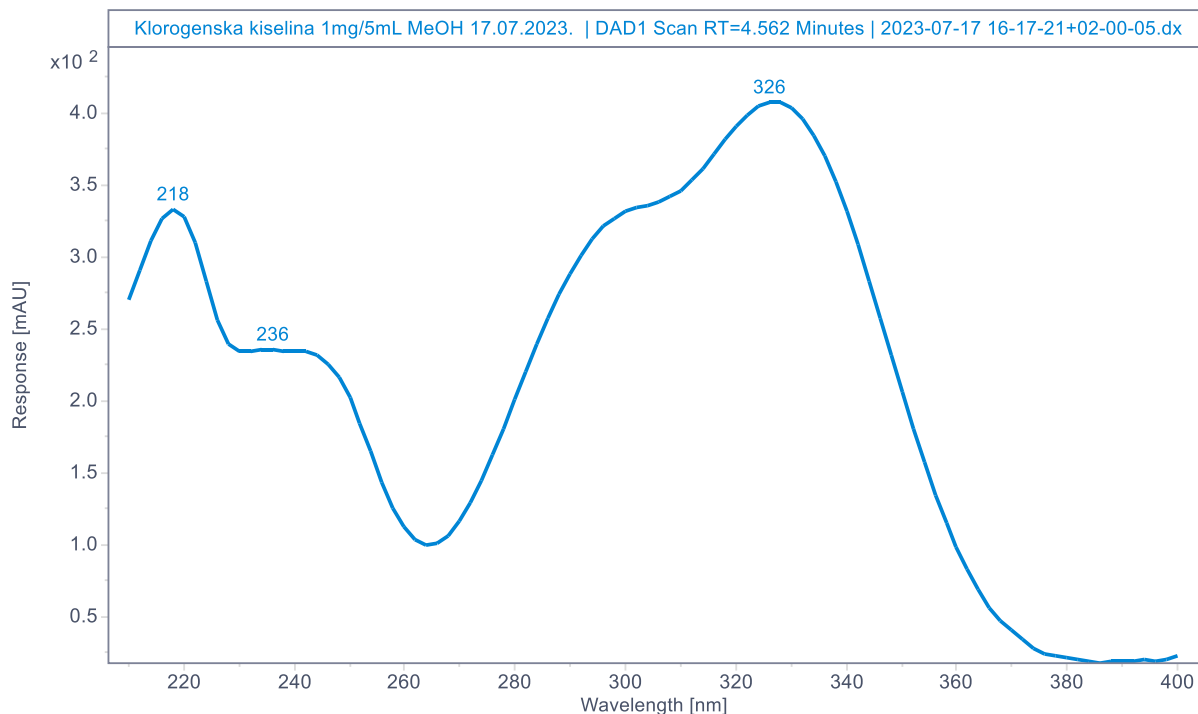
Slika 4.8 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi standardne otopine cikorijske kiseline u omjeru 1 mg / 5 mL MeOH. Retencijsko vrijeme je 8,921 min; površina ispod pika iznosi 8312.



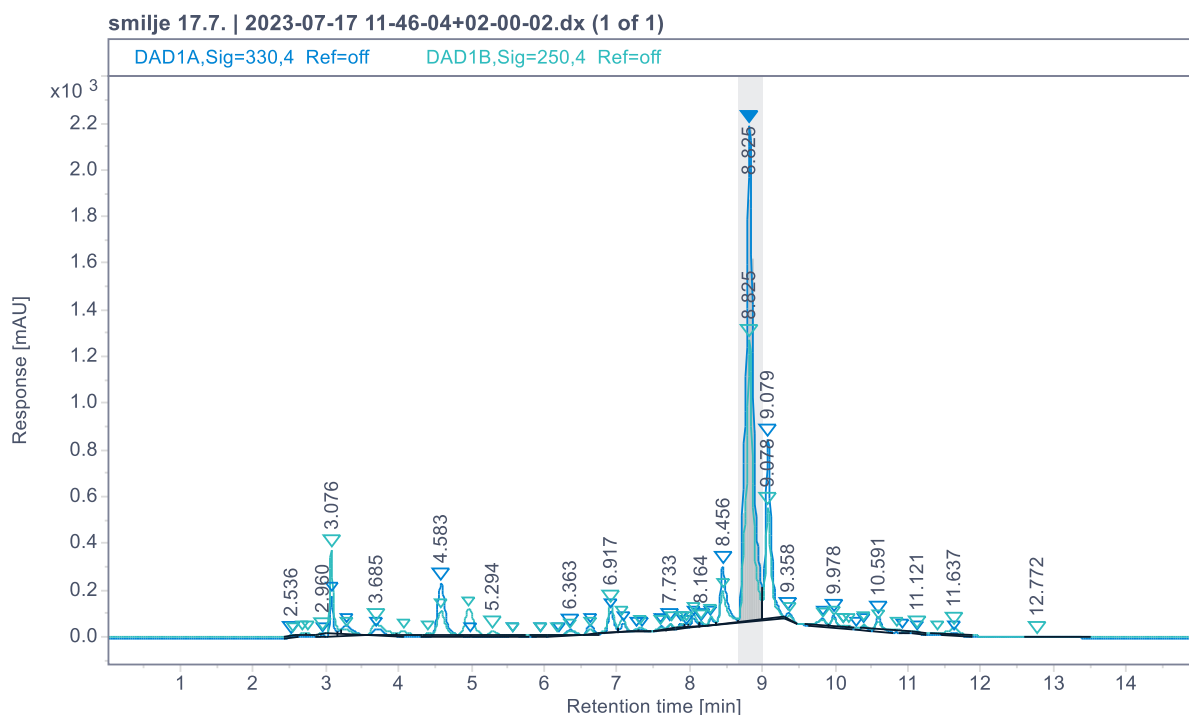
Slika 4.9 Prikaz UV-spektra cikorijske kiseline u omjeru 1 mg / 5 mL MeOH



Slika 4.10 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi standardne otopine klorogenske kiseline u omjeru 1 mg / 5 mL MeOH. Retencijsko vrijeme je 4,580 min; površina ispod pika iznosi 3209.



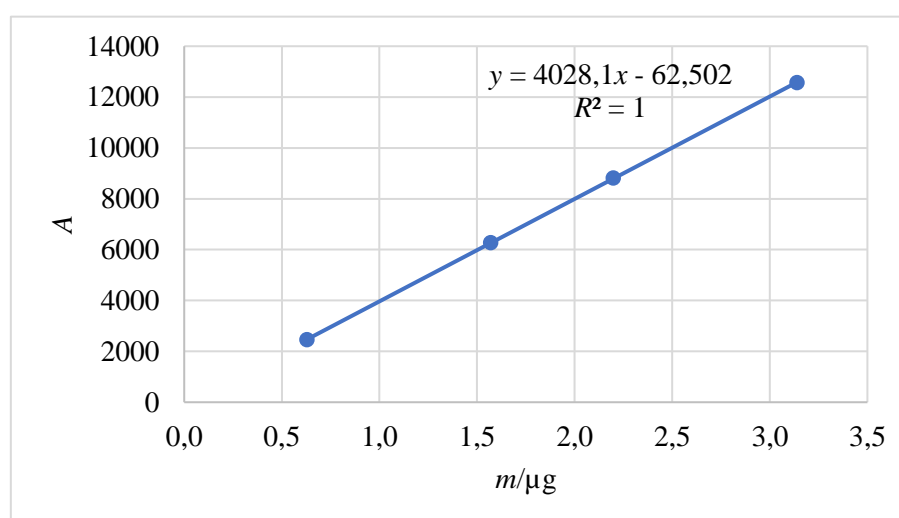
Slika 4.11 Prikaz UV-spektra klorogenske kiseline u omjeru 1 mg / 5 mL MeOH



Slika 4.12 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi 70 %-tnog etanola. Retencijsko vrijeme je 8,825 min; površina ispod pika iznosi 15329.

4.5.2. Baždarni dijagram

Baždarni dijagram cikorijske kiseline (*Slika 4.13*) dobiven je linearnom regresijom uz četiri kalibracijske točke i može se opisati izrazom $y = 4028,1x - 62,502$, uz determinacijski koeficijent $R^2 = 1$.

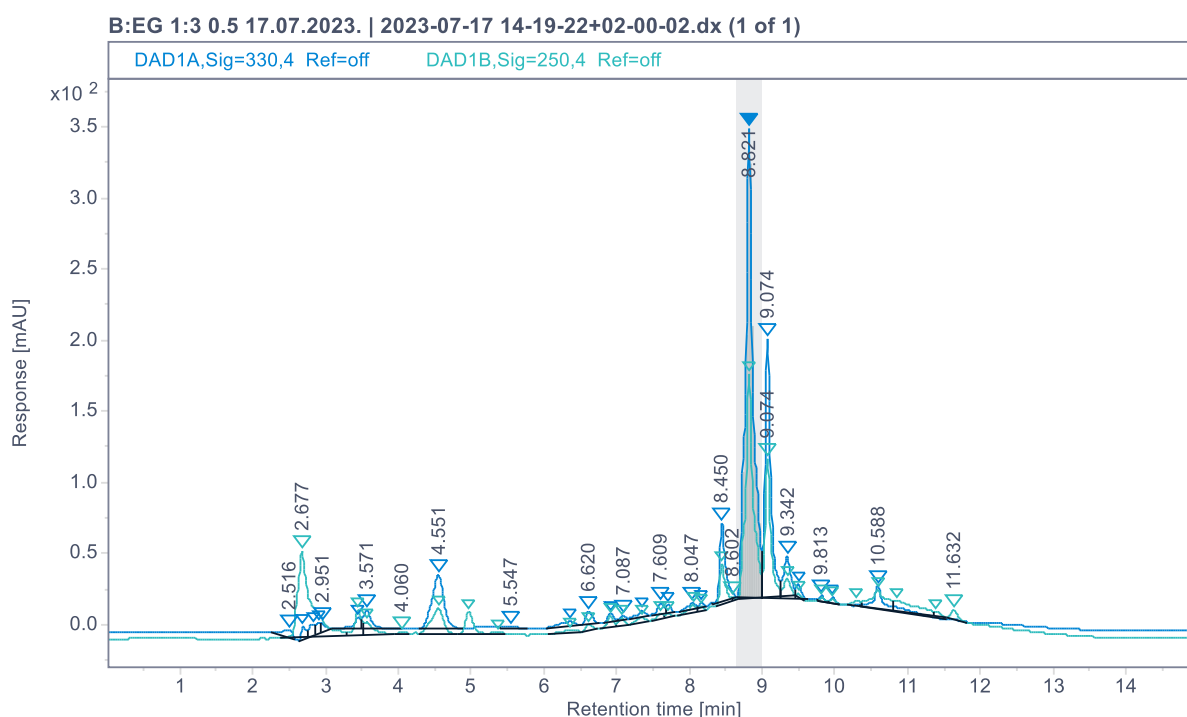


Slika 4.13 Baždarni dijagram cikorijske kiseline – ovisnost površine ispod pika o masi cikorijske kiseline u μg

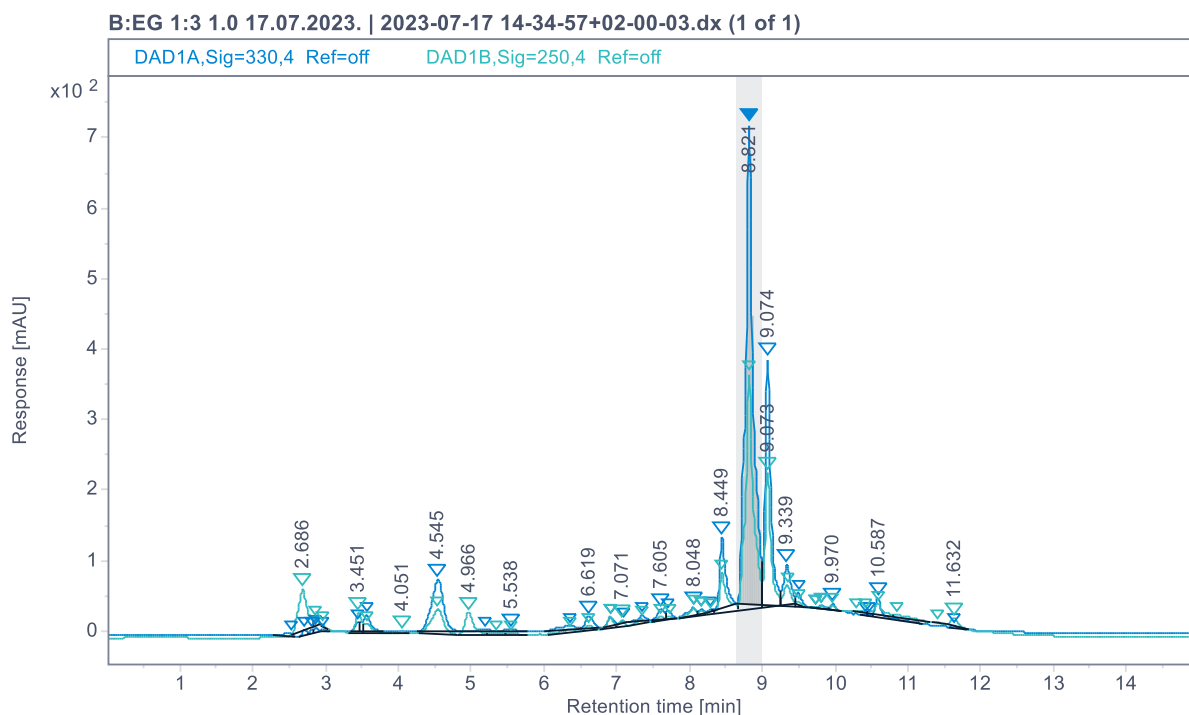
4.5.3. Rezultati određivanja cikorijske kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u različitim ekstraktima cvijeta smilja

Na Slikama 4.14 – 4.22 prikazani su kromatogrami dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakata na bazi DES-a B:EG različitih omjera HBA i HBD te različitih masa dodane suhe tvari smilja.

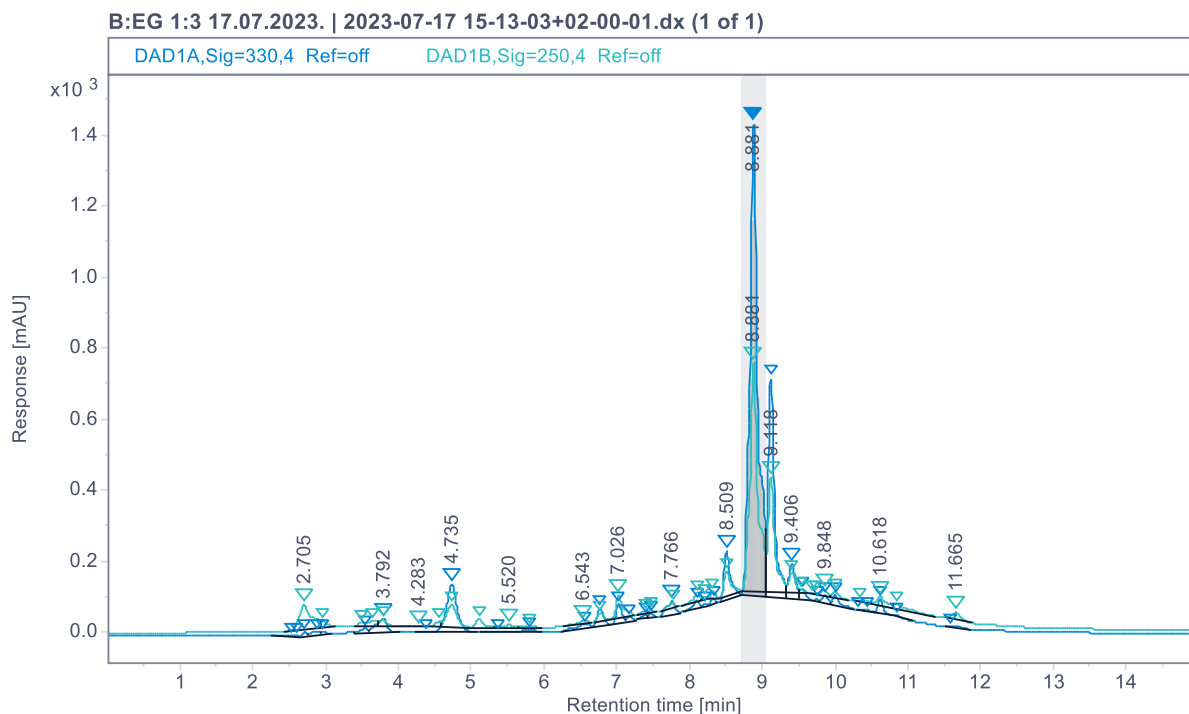
Na Slikama 4.23 – 4.31 prikazani su kromatogrami dobiveni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakata na bazi DES-a ChCl:EG različitih omjera HBA i HBD te različitih masa dodane suhe tvari smilja.



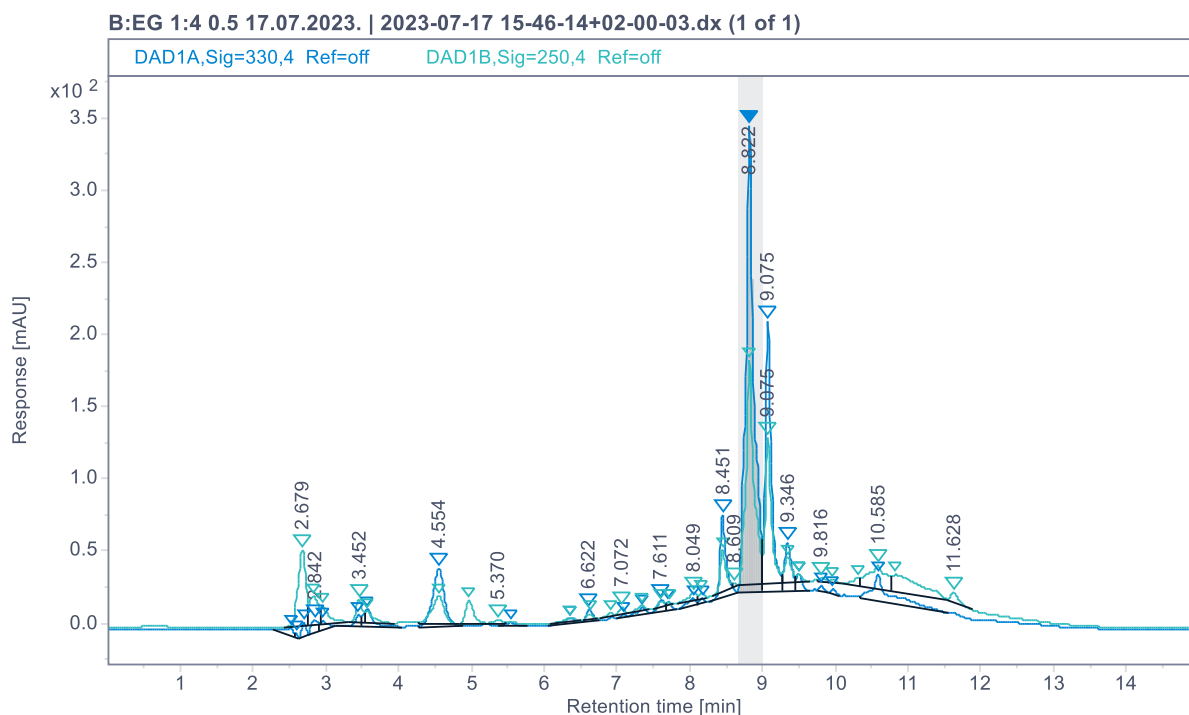
Slika 4.14 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:3 s 0,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,821 min; površina ispod pika iznosi 2447.



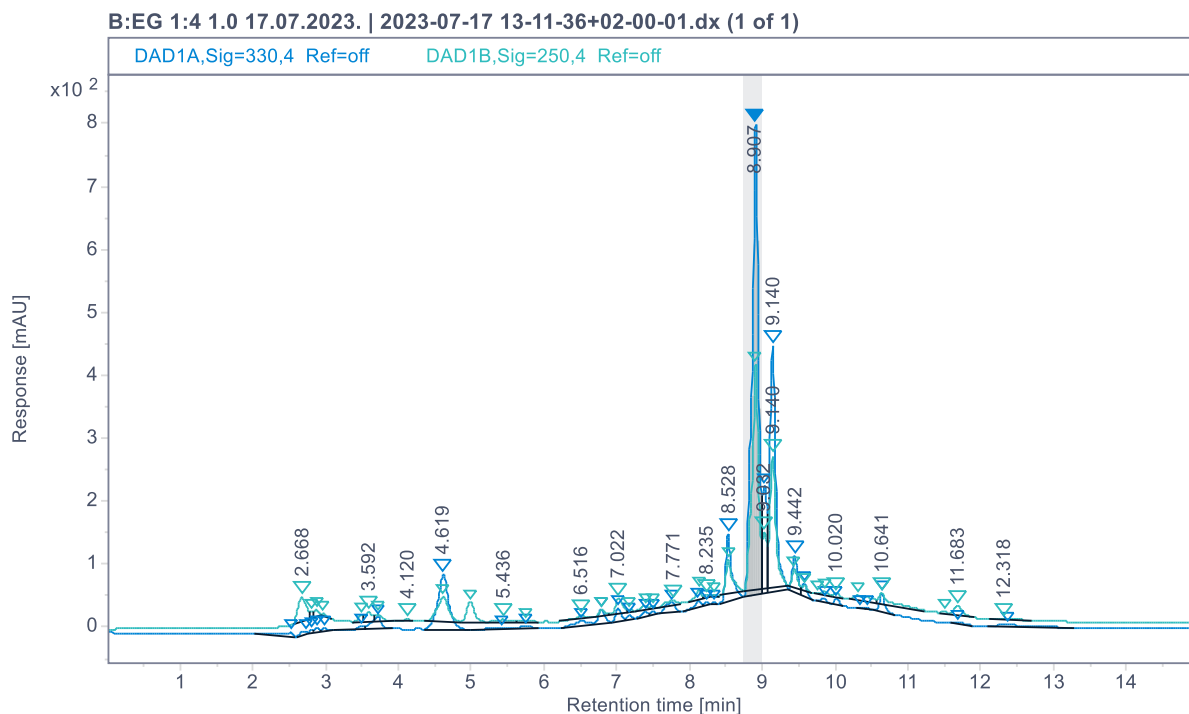
Slika 4.15 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:3 s 1,0 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,821 min; površina ispod pika iznosi 5079.



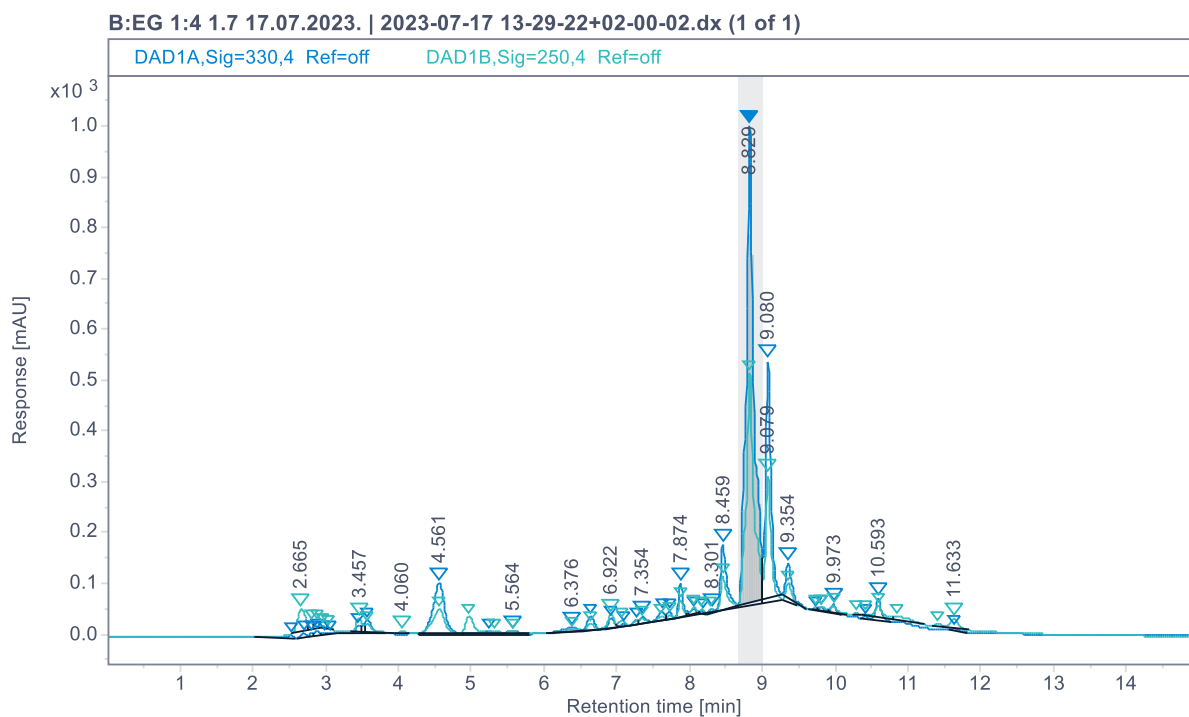
Slika 4.16 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:3 s 1,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,881 min; površina ispod pika iznosi 9977.



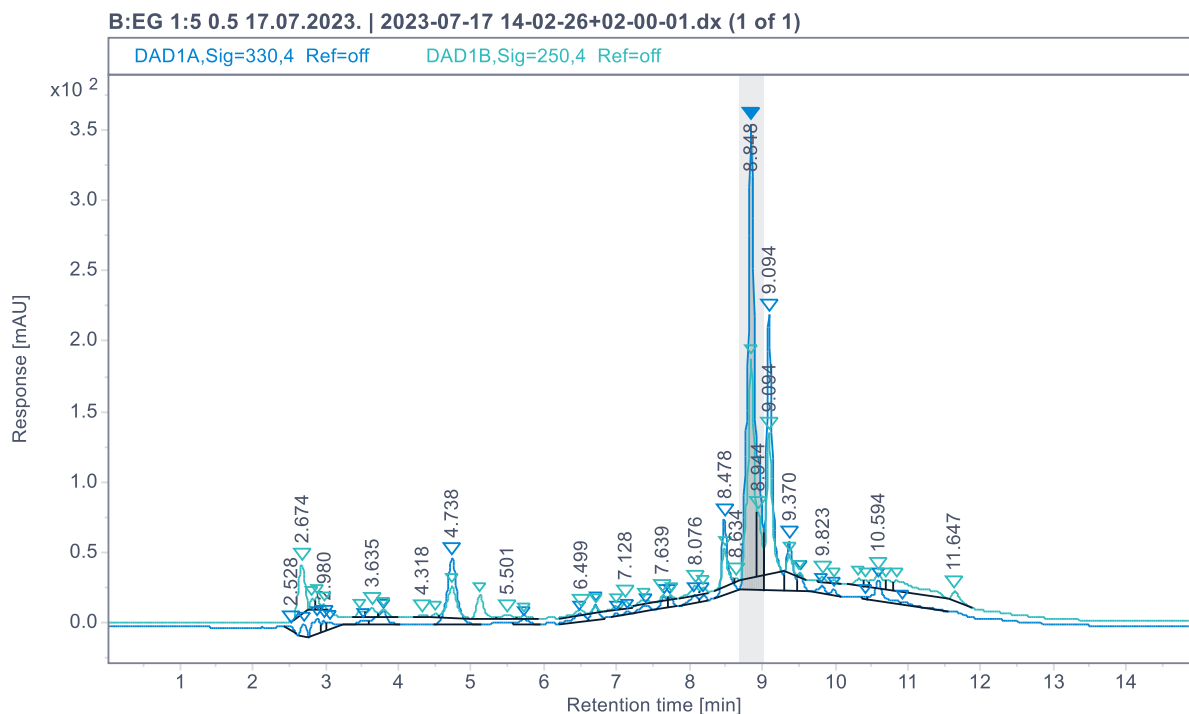
Slika 4.17 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:4 s 0,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,822 min; površina ispod pika iznosi 2477.



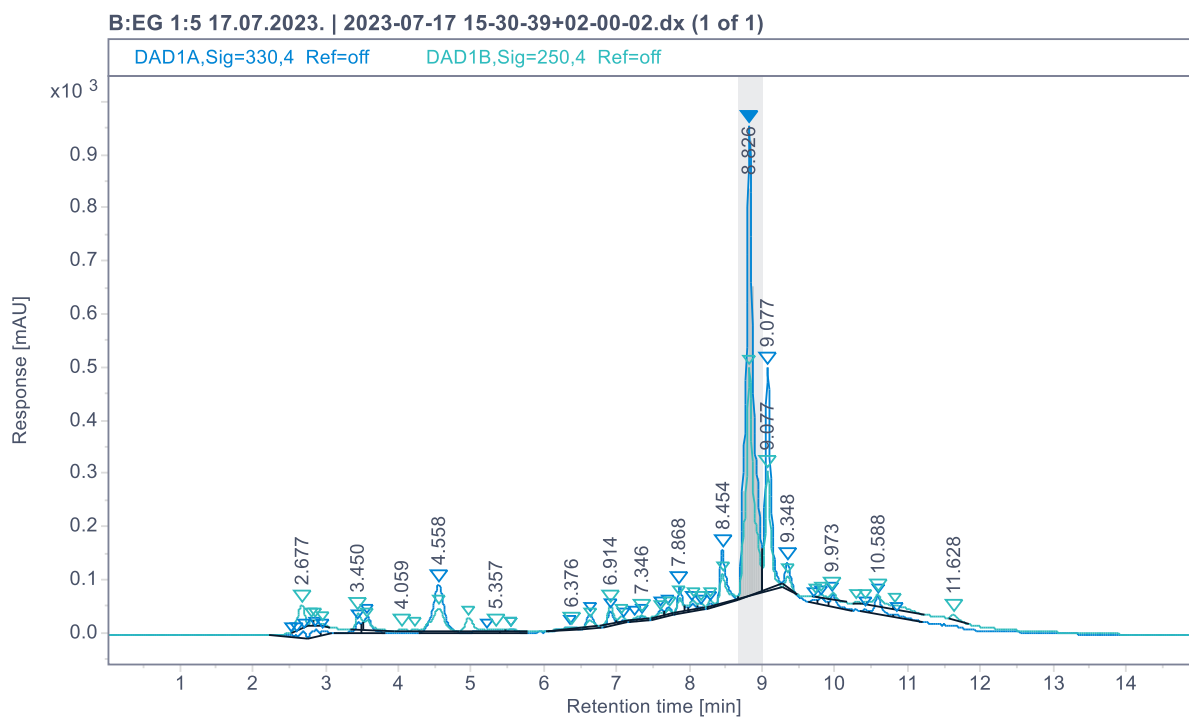
Slika 4.18 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:4 s 1,0 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,907 min; površina ispod pika iznosi 4684.



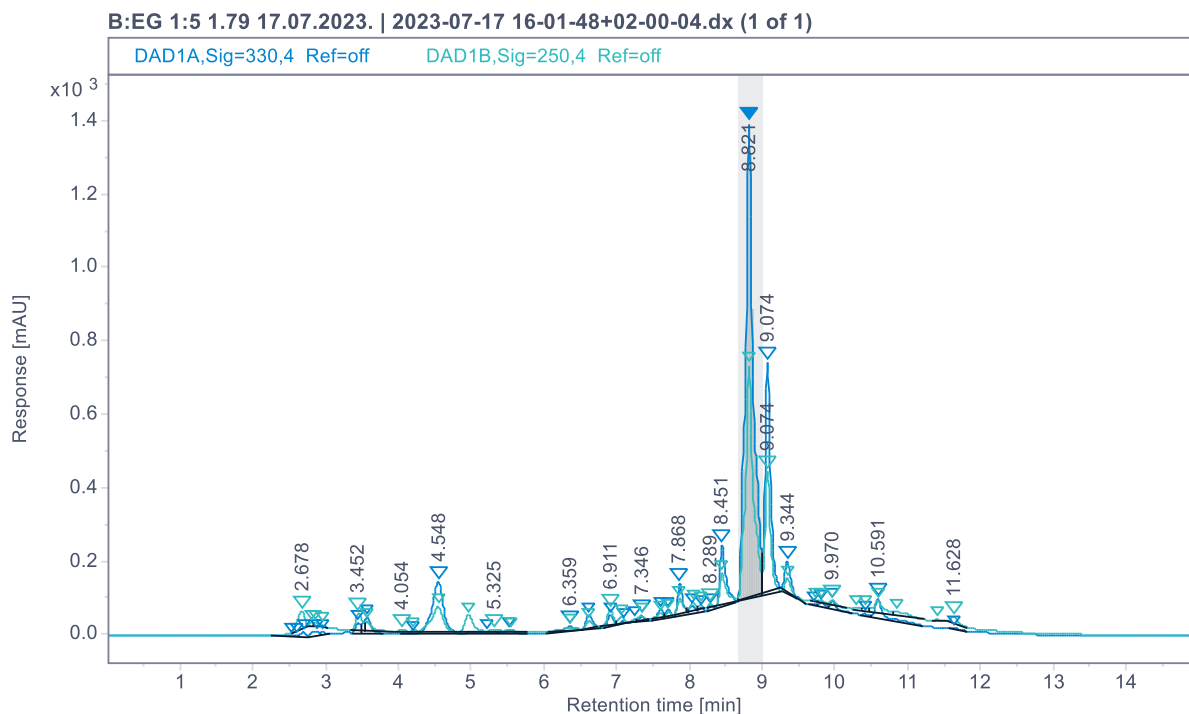
Slika 4.19 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:4 s 1,72 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,829 min; površina ispod pika iznosi 6901.



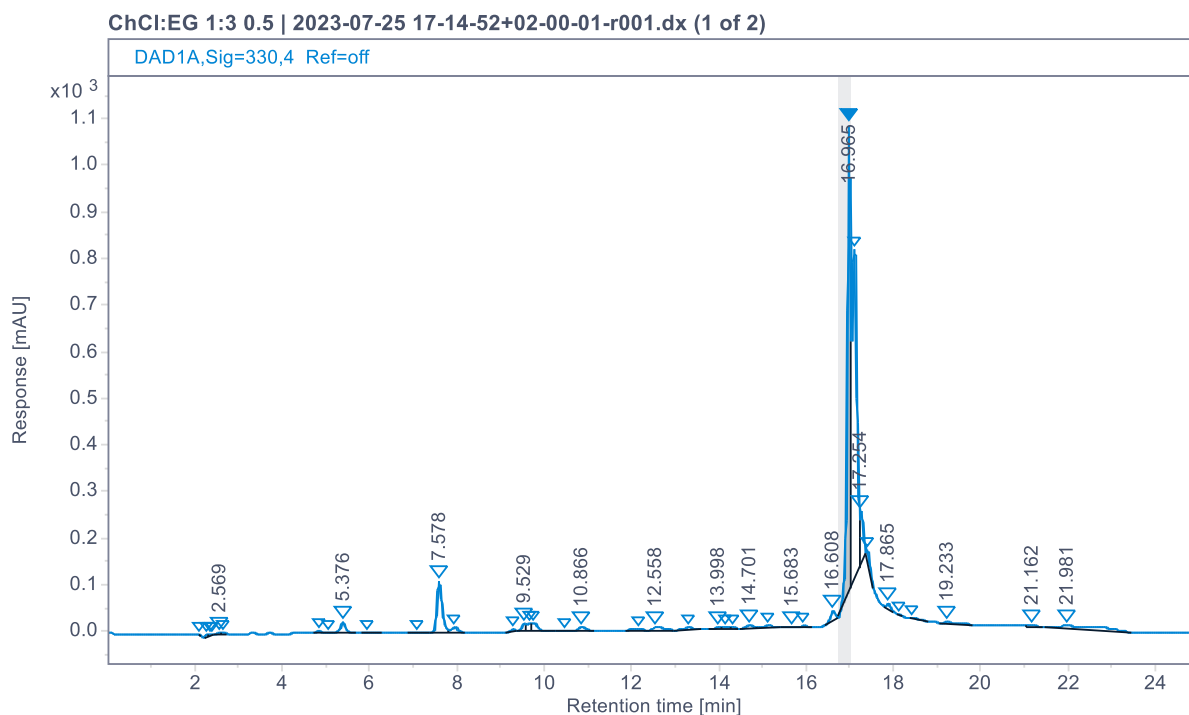
Slika 4.20 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:5 s 0,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,848 min; površina ispod pika iznosi 2452.



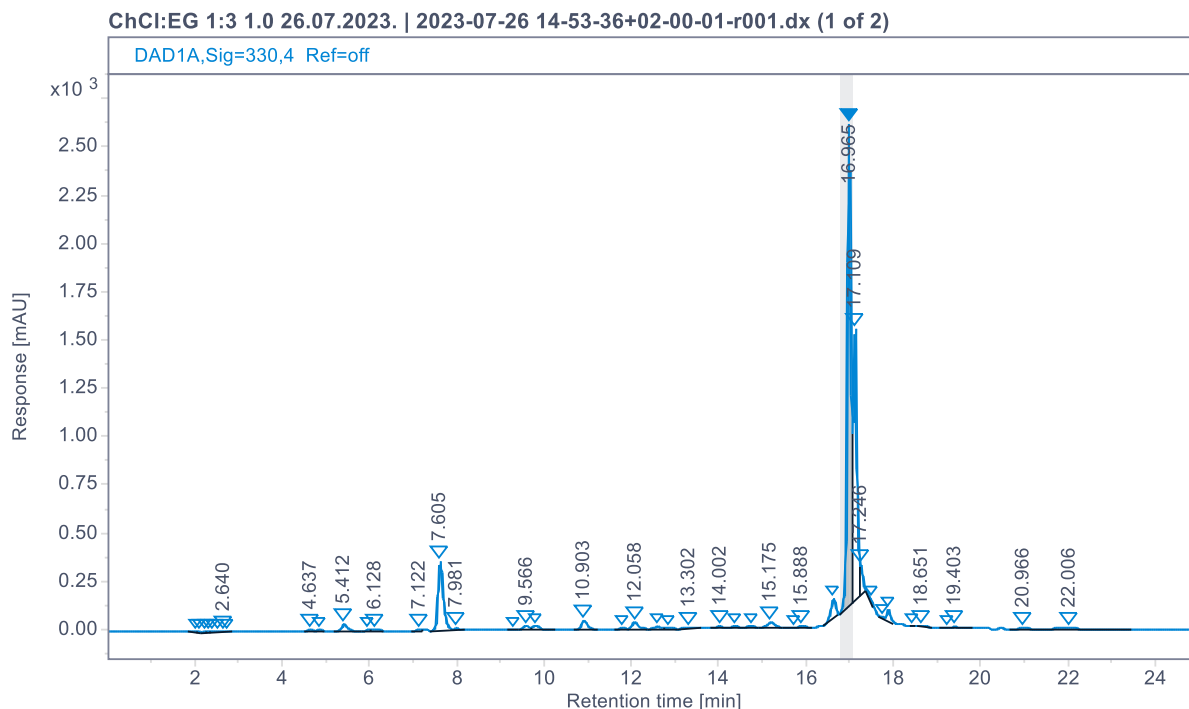
Slika 4.21 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:5 s 1,0 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,826 min; površina ispod pika iznosi 6547.



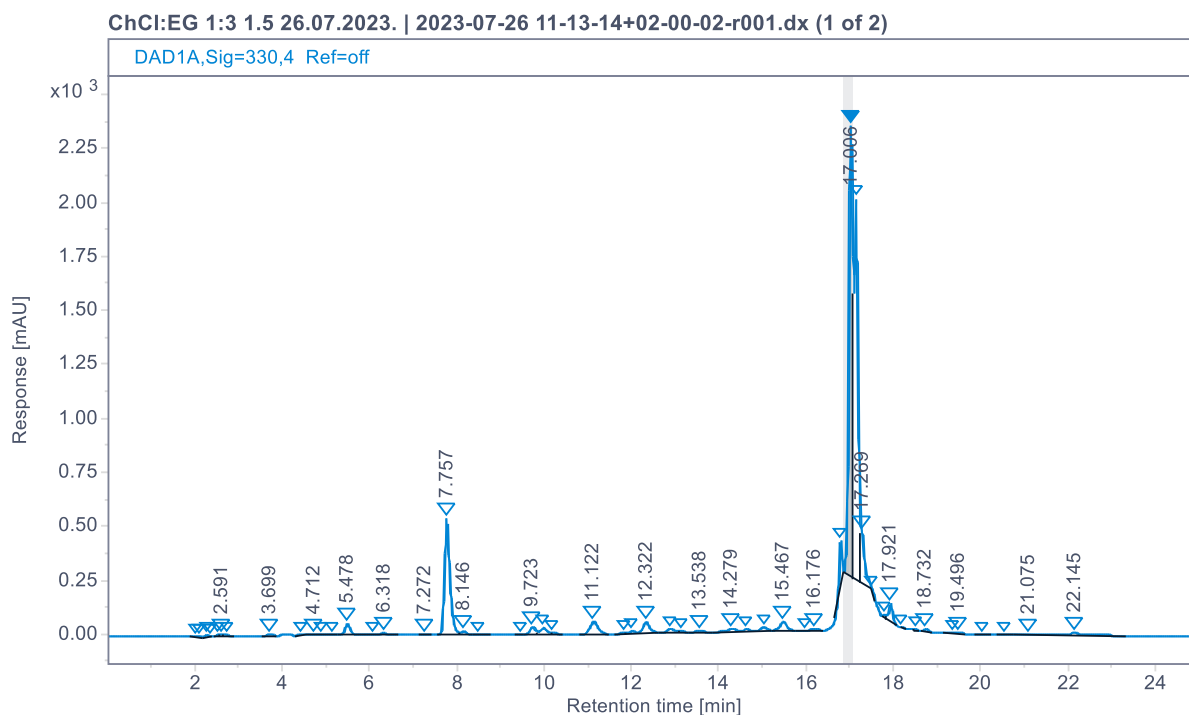
Slika 4.22 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a B:EG 1:5 s 1,79 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 8,821 min; površina ispod pika iznosi 9863.



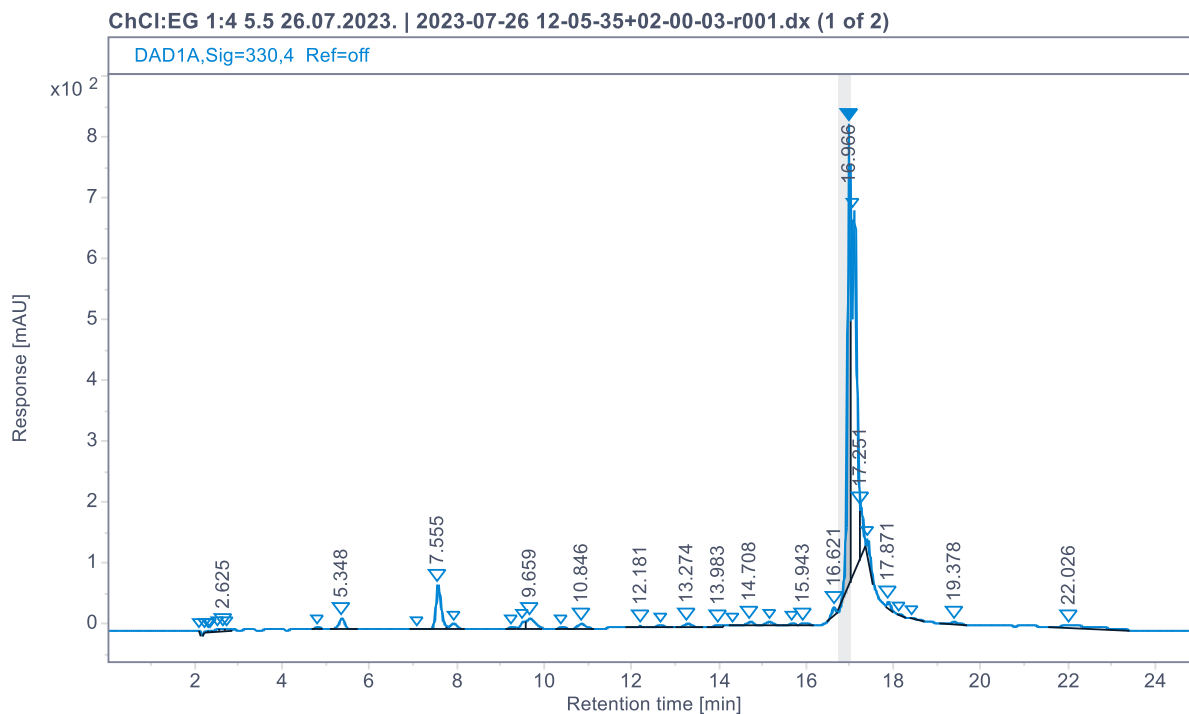
Slika 4.23 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:3 s 0,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,965 min; površina ispod pika iznosi 5293.



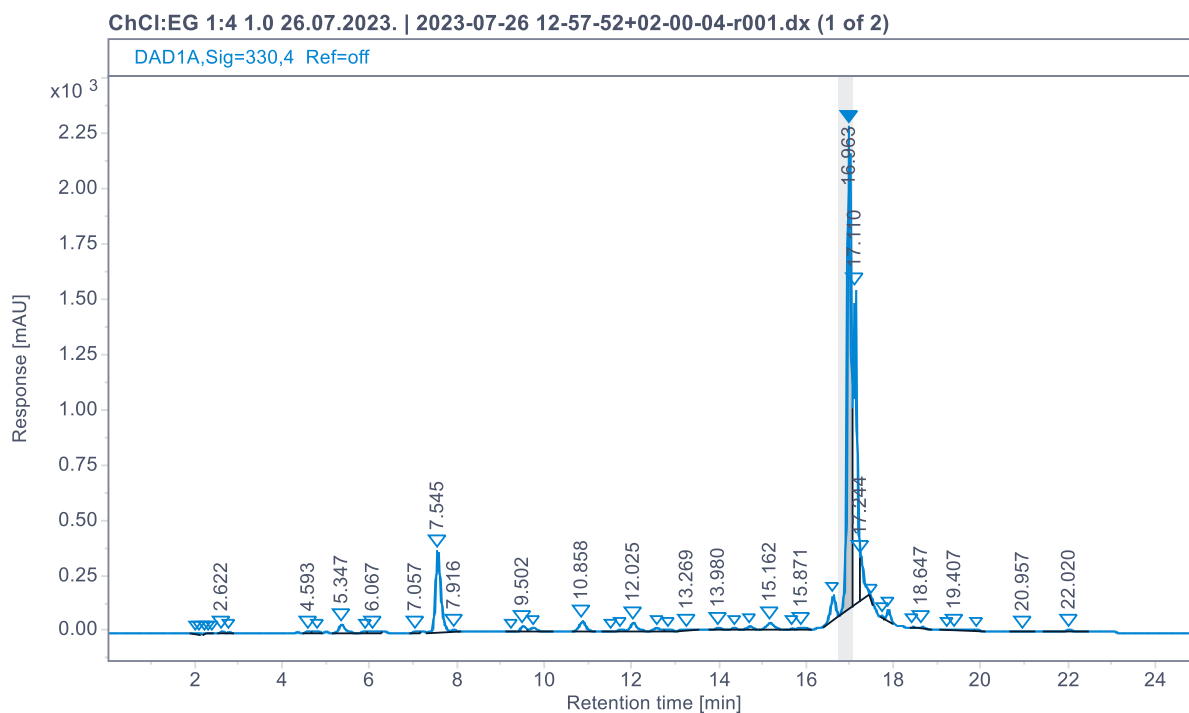
Slika 4.24 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:3 s 1,0 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,965 min; površina ispod pika iznosi 14480.



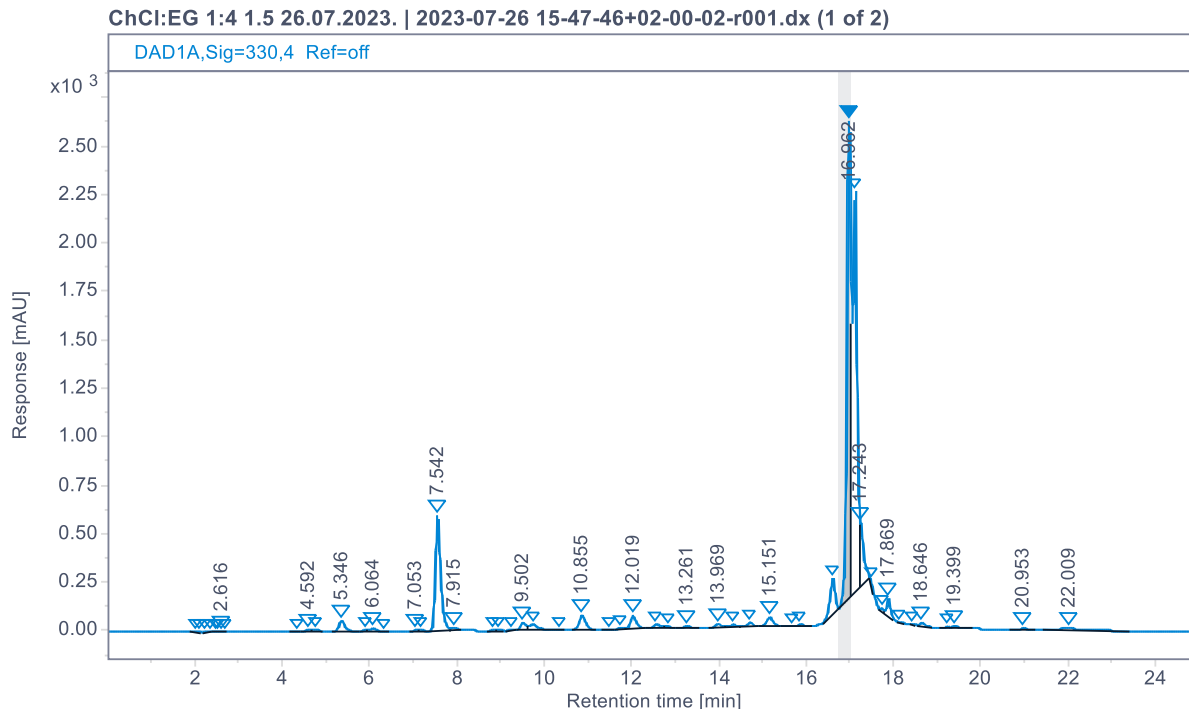
Slika 4.25 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:3 s 1,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 17,006 min; površina ispod pika iznosi 14892.



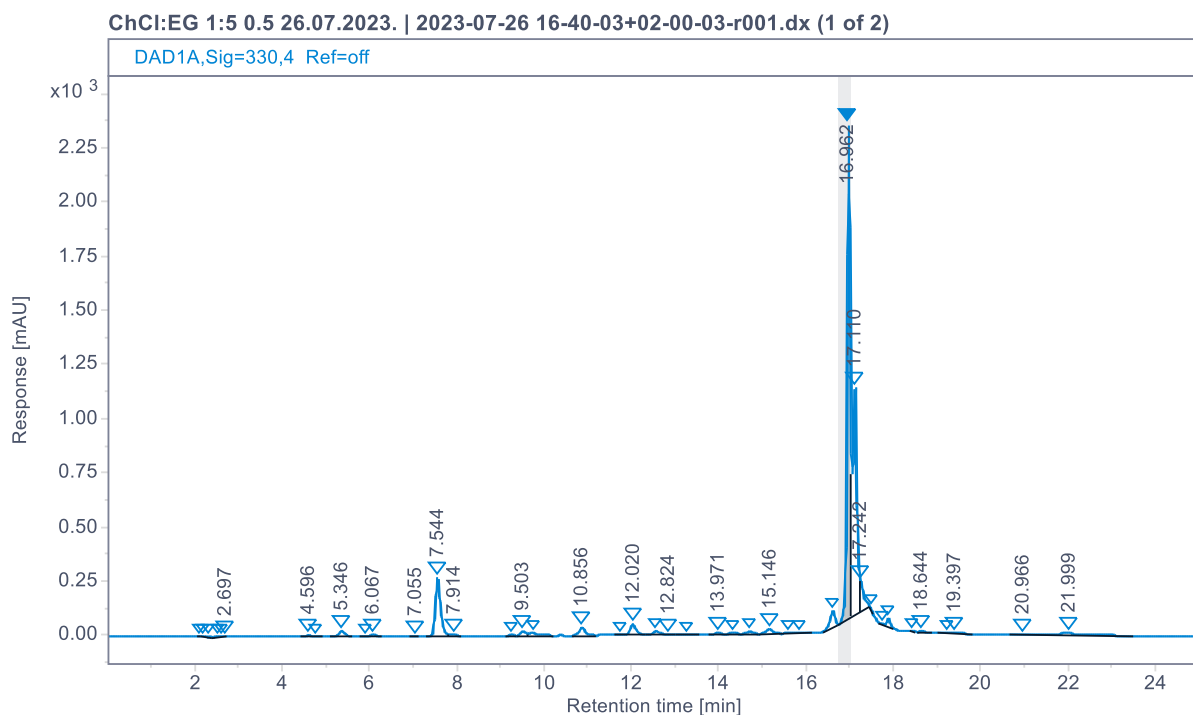
Slika 4.26 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:4 s 0,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,965 min; površina ispod pika iznosi 5293.



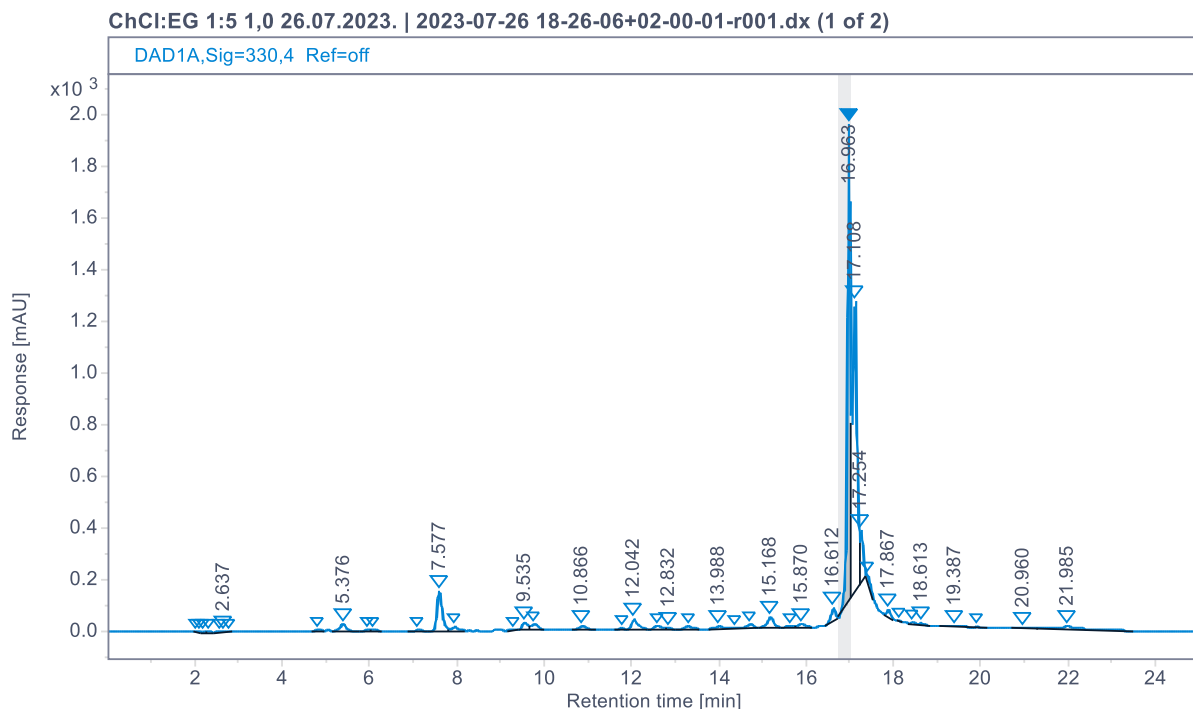
Slika 4.27 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:4 s 1,0 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,063 min; površina ispod pika iznosi 13892.



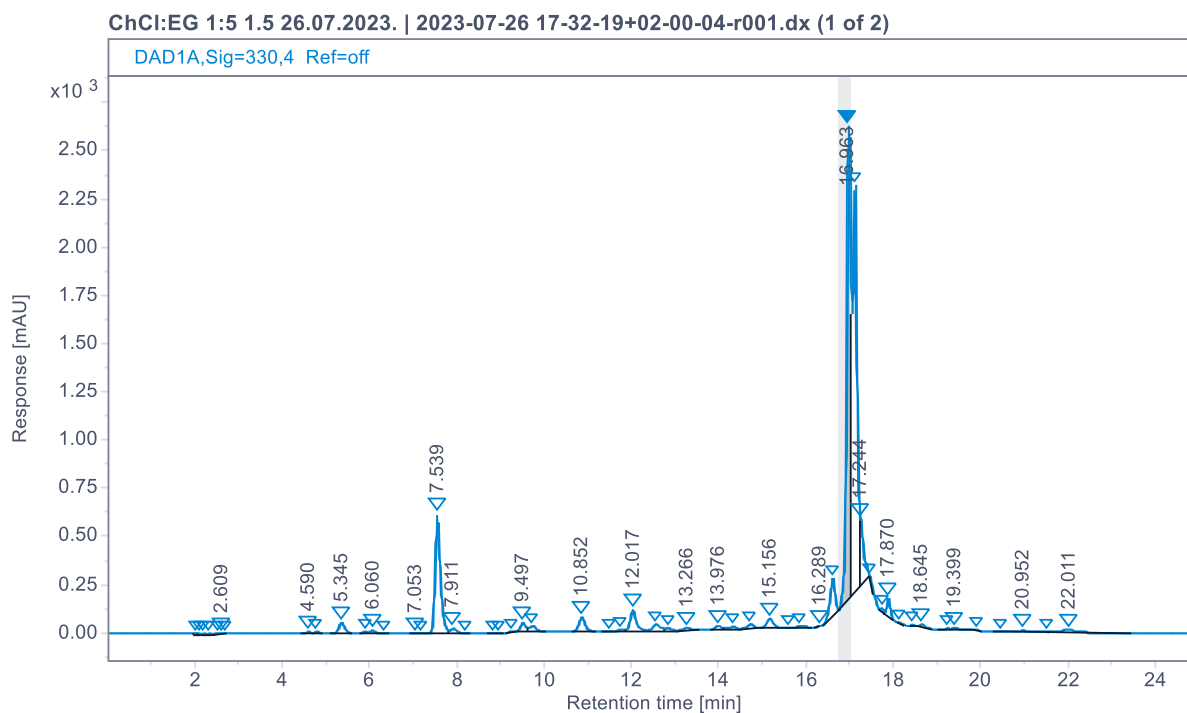
Slika 4.28 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:4 s 1,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,062 min; površina ispod pika iznosi 17690.



Slika 4.29 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:5 s 0,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,962 min; površina ispod pika iznosi 12010.



Slika 4.30 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:5 s 1,0 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,963 min; površina ispod pika iznosi 9171.



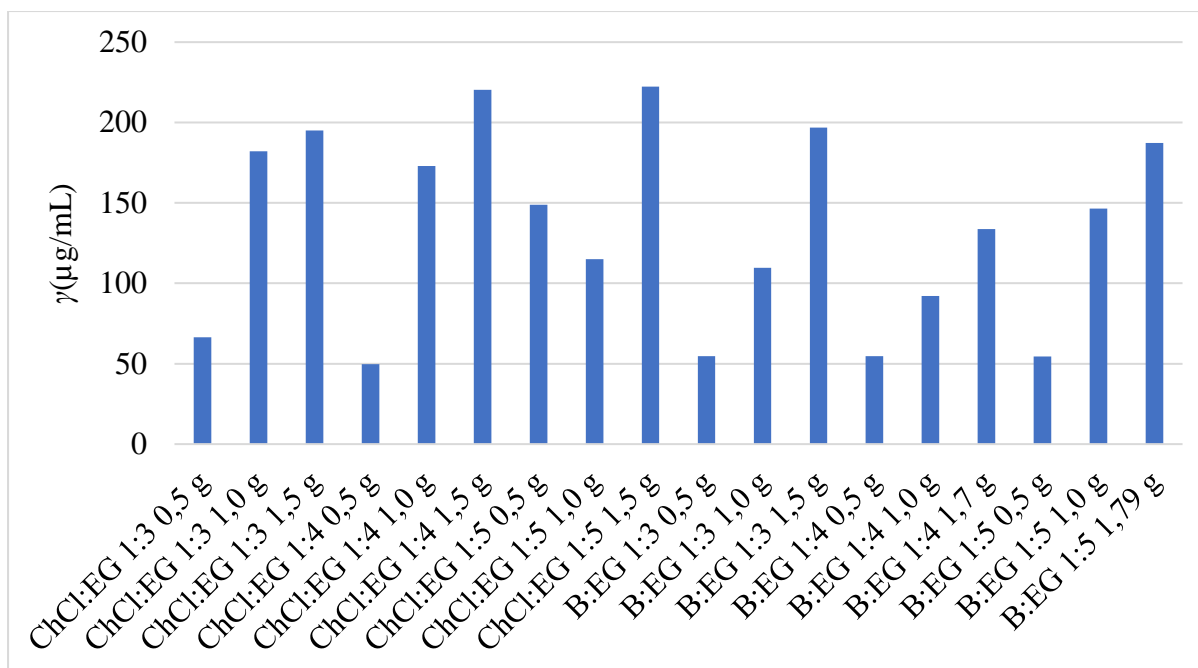
Slika 4.31 Kromatogram dobiven tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri analizi ekstrakta na bazi DES-a ChCl:EG 1:5 s 1,5 g suhe tvari smilja. Retencijsko vrijeme je 16,963 min; površina ispod pika iznosi 17855.

Iz dobivenih rezultata, tj. površina ispod pikova i jednadžbe dobivene baždarnim dijagramom, izračunata je koncentracija cikorijske kiseline u ispitivanim uzorcima. Rezultati su prikazani u *Tablici 4.8*.

Tablica 4.8 Koncentracije cikorijske kiseline izražene u $\mu\text{g/mL}$
u različitim ekstraktima cvijeta smilja

uzorak	koncentracija cikorijske kiseline ($\mu\text{g/mL}$)
ChCl:EG 1:3 0,5 g	66,35
ChCl:EG 1:3 1,0 g	182,14
ChCl:EG 1:3 1,5 g	195,05
ChCl:EG 1:4 0,5 g	49,65
ChCl:EG 1:4 1,0 g	172,86
ChCl:EG 1:4 1,5 g	220,42
ChCl:EG 1:5 0,5 g	148,79
ChCl:EG 1:5 1,0 g	115,00
ChCl:EG 1:5 1,5 g	222,39
B:EG 1:3 0,5 g	54,62
B:EG 1:3 1,0 g	109,74
B:EG 1:3 1,5 g	196,78
B:EG 1:4 0,5 g	54,70
B:EG 1:4 1,0 g	92,13
B:EG 1:4 1,7 g	133,74
B:EG 1:5 0,5 g	54,56
B:EG 1:5 1,0 g	146,44
B:EG 1:5 1,79 g	187,24

Prema rezultatima iz *Tablice 4.8* najveća koncentracija cikorijske kiseline nalazi se u ekstraktu ChCl:EG 1:5 s 1,5 g suhe tvari smilja. Najmanja koncentracija cikorijske kiseline nalazi se u ChCl:EG 1:4 s 0,5 g suhe tvari smilja. S povećanjem mase suhe biljne tvari povećava se i koncentracija cikorijske kiseline. Jedino je za ChCl:EG 1:5 dobiveno da je veća koncentracija cikorijske kiseline dobivena s manjom masom suhe tvari smilja. Rezultati su grafički prikazani na *Slici 4.32*.



Slika 4.32 Koncentracija cikorijske kiseline izražena u $\mu\text{g/mL}$ za različite ekstrakte cvijeta smilja

Cikorijska kiselina je derivat kafeinske kiseline što znači da se ubraja u skupinu fenolnih spojeva. Pri usporedbi rezultata dobivenih određivanjem sadržaja fenolnih kiselina UV/VIS-spektrofotometrijskom metodom i rezultata dobivenih HPLC-metodom vidi se jednak trend porasta sadržaja cikorijske kiseline i ukupnog sadržaja fenolnih kiselina (iskazanih kao klorogenska kiselina, *Slika 4.1*). Jedino opaženo odstupanje je kod ChCl:EG 1:5 gdje je koncentracija veća kod mase 0,5 g, nego kod 1,0 g suhe tvari smilja. Također, koncentracija cikorijske kiseline podjednaka je za ChCl:EG 1:4 i 1:5, dok se kod fenolnih kiselina vidi veća razlika u udjelima. Spektrofotometrijskom metodom dobiveno je da je B:EG 1:5 najpogodniji za ekstrakciju ukupnih fenolnih kiselina dok je HPLC-metodom dobiveno da je ChCl 1:5 najpogodniji za ekstrakciju cikorijske kiseline.

5. ZAKLJUČAK

Tijekom izrade diplomskog rada provedena su brojna ispitivanja da bi se istražila mogućnost uporabe zelenih otapala kao zamjene za organska otapala. Na osnovi određivanja sadržaja polifenolnih spojeva: fenolnih kiselina, flavonoida i treslovina pomoću UV-VIS spektrofotometrijske metode prema farmakopejskom postupku dobiveni su sljedeći zaključci.

DES na bazi betaina i etilen-glikola pokazao se boljim od DES-a na bazi kolin-klorida i etilen-glikola za ekstrakciju fenolnih kiselina iz cvijeta smilja. Prema rezultatima, najbolji je B:EG 1:5 s najvećom masom suhe tvari smilja. S povećanjem udjela HBD-a (etilen-glikola) raste i udio fenolnih kiselina u ekstraktu. Oba DES-a bolja su od etanola za ekstrakciju fenolnih kiselina.

Za određivanje flavonoida također se pokazao boljim DES na bazi betaina i etilen-glikola. Najbolji je B:EG 1:3 s najvećom masom suhe tvari smilja. Za DES B:EG s povećanjem mase suhe tvari smilja raste udio flavonoida, a za DES ChCl:EG udio flavonoida smanjuje se s porastom mase suhe tvari smilja. B:EG 1:3 znatno je bolji od etil-acetata za ekstrakciju flavonoida, a svi ostali DES-ovi podjednaki su s etil-acetatom.

Za određivanje treslovina dobiveno je da je najbolji DES ChCl:EG 1:4 s najmanjom masom suhe tvari smilja. Opažene su velike oscilacije u rezultatima sadržaja smilja u ekstraktima što može biti posljedica interakcija između spojeva i DES-a, ali se više toga ne da zaključiti bez daljnjih ispitivanja. Zbog navedenog, treslovine nisu dalje istraživane.

Kod određivanja ekstrakcijskog kapaciteta vidljivo je da s povećanjem broja ekstrakcijskih stupnjeva dolazi do smanjenja udjela i fenolnih kiselina i flavonoida, umjesto do očekivanog porasta. Za fenolne kiseline upotrijebljeni su ChCl:EG 1:5 i B:EG 1:5 koji su se ranije pokazali kao najbolja otapala za ekstrakciju unutar dviju skupina DES-ova. Isto tako, za flavonoide su istraženi DES-ovi ChCl:EG 1:3 i B:EG 1:3. Za sva četiri ispitivanja dobiveno je da je maksimalni (ravnotežni) ekstrakcijski kapacitet postignut u prvom stupnju.

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti određena je koncentracija cikorijske kiseline u različitim ekstraktima cvijeta smilja. DES ChCl:EG 1:5 pokazao se najbolji za ekstrakciju cikorijske kiseline. Cikorijska kiselina je derivat kafeinske kiseline koja se ubraja u fenolne kiseline. To znači da rezultati dobiveni tekućinskom kromatografijom ne slijede one dobivene UV/VIS spektrofotometrijskim određivanjem.

6. POPIS OZNAKA

B	betain (engl. <i>betaine</i>)
ChCl	kolin-klorid (engl. <i>choline chloride</i>)
DES	niskotemperaturno eutektičko otapalo (engl. <i>deep eutetic solvent</i>)
EG	etilen-glikol (engl. <i>ethylene glycol</i>)
HBD	donor protona (engl. <i>hydrogen bond donor</i>)
HBA	akceptor protona (engl. <i>hydrogen bond acceptor</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
MeOH	metanol (engl. <i>methanol</i>)
UV/VIS	ultravioletna/vidljiva

7. LITERATURA

1. P. T. Anastas, J. C. Warner: *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, 1998.
2. A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah: *Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures*, Chem. Commun. (2003) 70–71.
3. Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jerome: *Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications*, Chem. Soc. Rev. **41** (2012) 7108–7146.
4. L. A. Rodrigues, M. Cadeira, I. C. Leonardo, F. B. Gaspar, I. Radojčić Redovniković, A. R. C. Duarte, A. Paiva, A. A. Matias: *Deep eutectic systems from betaine and polyols – Physicochemical and toxicological properties*, J. Mol. Liq. **335** (2021) 116201–116213.
5. A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, A. R. C. Duarte: *Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century*, ACS Sustainable Chem. Eng. **2** (2014) 1063–1071.
6. P. J. Hellivan: *Immortelle's sustainable resurgence*, Perfum. Flavor **34** (2009) 34–40
7. T. Ninčević, M. Grdiša, Z. Šatović, M. Jug-Dujaković: *Helichrysum italicum (Roth) G. Don: Taxonomy, biological, activity, biochemical and genetic diversity*, Ind. Crops Prod. **138** (2019) 111487–111497.
8. D. V. Wagle, H. Zhao, G. A. Baker: *Deep eutectic solvents: sustainable media for nanoscale and functional materials*, Acc. Chem. Res. **47** (2014) 2299–2308.
9. H. Zhao: *DNA stability in ionic liquids and deep eutectic solvents*, J. Appl. Chem. Biotechnol. **90** (2015) 19–25.
10. C. Li, D. Li, S. Zou, Z. Li, J. Yin, A. Wang, Y. Cui, Z. Yao, Q. Zhao: *Extraction desulfurization process of fuels with ammonium-based deep eutectic solvents*, Green Chem. **15** (2013) 2793–2799.
11. L. Duan, L.-L. Dou, L. Guo, P. Li, E.-H. Liu: *Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products*, ACS Sustain. Chem. Eng. **4** (2016) 2405–2411.
12. A. Mari, A. Napolitano, M. Masullo, C. Pizza, S. Piacente: *Identification and quantitative determination of the polar constituents in Helichrysum italicum flowers and derived food supplements*, J. Pharm. Biomed. Anal. **96** (2014) 249–255.
13. R. Tundis, G. A. Statti, F. Conforti, A. Bianchi, C. Agrimonti, G. Sacchetti, M. Muzzoli, M. Ballero, F. Menichini, F.R. Poli: *Influence of environmental factors on*

- composition of volatile constituents and biological activity of Helichrysum italicum (Roth) Don (Asteraceae)*, Nat. Prod. Res. **19** (2005), 379–387.
14. S. Melito, A. Sias, G. L. Petretto, M. Chessa, G. Pintore, A. Porceddu: *Genetic and metabolite diversity of Sardinian populations of Helichrysum italicum*, PLoS One **8** (2013) 79043.
 15. A. B. Arbeiter, M. Hladnik, J. Jakše, D. Bandelj: *First set of microsatellite markers for immortelle (Helichrysum italicum (Roth) G. Don): A step towards the selection of the most promising genotypes for cultivation*, Ind. Crops Prod. **162** (2021) 113298.
 16. V. Nebriđić, A. Cvetanović Kljakić, G. M. Terzić, P. Mašković, M. Radojković: *Effects of extraction and drying techniques on the chemical composition and biological activities of Helichrysum italicum*, Process Biochem. **130** (2023) 96–104.
 17. O. Tagliatalata-Scafati, F. Pollastro, G. Chianese, A. Minassi, S. Gibbons, W. Arunotayanun, B. Mabebie, M. Ballero, G. Appendino, *Antimicrobial phenolics and unusual glycerides from Helichrysum italicum subsp. Microphyllum*, J. Nat. Prod. **76** (2013) 346–353.
 18. G. R. Schinella, H. A. Tournier, J. M. Prieto, P. Mordujovich de Buschiazzo, J. L. Rios: *Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts*, Life Sci. **70** (2002) 1023–1033.
 19. K. Schnaubelt: *Medical Aromatherapy – Healing with Essential Oils*, Frogs LTD., 1999.
 20. R. J. Robbins: *Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology*, J. Agric. Food. Chem. **51** (2003) 2866–2887.
 21. K. Herrmann: *Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods*, Crit. Rev Food Sci. Nutr. **28** (1989) 315–347.
 22. M. Heinrich, J. Barnes, S. Gibbons, E. M. Williamson: *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Churchill Livingstone Elsevier, 2012, str. 75–77.
 23. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 2000, str. 1303.
 24. H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang, S. M. Lim: *Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits*, Food Nutr. Res. **61** (2017) 1361779.
 25. M. Fraga-Corral, P. García-Oliveira, A. G. Pereira, C. Lourenço-Lopes, C. Jimenez-Lopez, M. A. Prieto, J. Simal-Gandara: *Technological application of tannin-based extracts*, Molecules **25** (2020) 614.

26. S. Bajkacz, J. Adamek: *Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples*, *Food Anal. Methods* **11** (2017) 1330–1344.
27. F. Chemat, M. Abert Vian, G. Cravotto: *Green extraction of natural products: Concept and principles*, *Int. J. Mol. Sci.* **13** (2012) 8615–8627.
28. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol> (pristup 1. veljače 2024.)
29. E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder: *Deep eutectic solvents (DESs) and their applications*, *Chem. Rev.* **114** (2014) 11060–11082.
30. N. P. Ermi Hikmawanti, S. Fatmawati, A. W. Asri: *The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (Sauropus androgynus (L.) Merr.) Leaves Extracts*, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, **755** (2021) 1–7.
31. P. Tiwari, B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, H. Kaur: *Phytochemical screening and Extraction: A Review*, *Int. pharm. sci.* **1** (2011) 98–106.
32. Q. D. Do, A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, Y.-H. Ju: *Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica*, *J. Food Drug Anal.* **22** (2014) 296–302.
33. S. W. Munthe, R. Riskianto, D. Juvi, J. Novia: *Antioxidant, Total Phenolic, and Total Flavonoid of 70% Ethanol Extract of Avocado Seeds (Persea americana Mill.)*, *Pharmacogn. J.* **15** (2023) 599–605.
34. D. Turck, J. L. Bresson, B. Burlingame, T. Dean, S. Fairweather Tait, M. Heinonen, K. I. Ernst, I. Mangelsdorf, H. J. McArdle, A. Naska, M. Neuhäuser Berthold, G. Nowicka, K. Pentieva, Y. Sanz, A. Siani, A. Sjödin, M. Stern, D. Tomé, M. Vinceti, P. Willatts, K. Engel, R. Marchelli, A. Pöting, M. Poulsen, R. Josef, E. Turla, H. van Loveren: *Safety of betaine as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97*, *EFSA J.* **15** (2017) 1.
35. G. R. Gomes, R. R. Mattioli, J. C. Pastre: *Amino acid-based deep eutectic solvents in biomass processing – recent advances*, *J. Braz. Chem. Soc.* **33** (2022) 815–823.
36. European Food Safety Authority (EFSA), <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2353> (pristup 1. veljače 2024.)

37. K. Zagajski Kučan, M. Perković, K. Cmrk, D. Načinović, M. Rogošić: *Betaine + (glycerol or ethylene glycol or propylene glycol) deep eutectic solvents for extractive purification of gasoline*, *ChemistrySelect* **3** (2018) 12582–12590.
38. S. Anđelović, M. Božinović, Ž. Ćurić, A. Šalić, A. Jurinjak Tušek, K. Zagajski Kučan, M. Rogošić, M. Radović, M. Cvjetko Bubalo, B. Zelić: *Deep Eutectic Solvents for Biodiesel Purification in a Microextractor: Solvent Preparation, Selection and Process Optimization*, *Bioengineering* **9** (2022) 665.
39. C. Fanali, S. Della Posta, L. Dugo, A. Gentili, L. Mondello, L. De Gara: *Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **189** (2020) 113421.
40. Frauenkron, M., Melder, J.-P., Ruider, G., Rossbacher, R., Höke, H., 2002. *Ethanolamines and Propanolamines*, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Vol. 13, Wiley, 2002. str. 413.
41. A. Šalić, A. Jurinjak Tušek, M. Gojun, B. Zelić: *Biodiesel purification in microextractors: Choline chloride based deep eutectic solvents vs water*, *Sep. Purif. Technol.* **242** (2020) 116783.
42. M. Rogošić, K. Zagajski Kučan: *Deep eutectic solvents based on choline chloride and ethylene glycol as media for extractive denitrification/desulfurization/dearomatization of motor fuels*, *J. Ind. Eng. Chem.* **72** (2018) 87–99.
43. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174> (pristup 2. veljače 2024.)
44. R. K. Ibrahim, M. Hayyan, M. A. AlSaadi, S. Ibrahim, A. Hayyan, M. A. R. Hashim: *Physical properties of ethylene glycol-based deep eutectic solvents*, *J. Mol. Liq.* **276** (2019) 794–800.
45. 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.
46. M. Yang, C. Wu, T. Zhang, L. Shi, J. Li, H. Liang, X. Lv, F. Jing, L. Qin, T. Zhao, C. Wang, G. Liu, S. Feng, F. Li: *Chicoric acid: Natural occurrence, chemical synthesis, biosynthesis, and their bioactive effects*, *Front Chem.* **10** (2022) 888673.
47. I. Generalić Mekinić, D. Skroza, I. Ljubenković, L. Krstulović, S. Smole Možina, V. Katalinić: *Phenolic acids profile, antioxidant and antibacterial activity of chamomile, common yarrow and immortelle (Asteraceae)*, *Nat. Prod Commun.* **9** (2014) 1745–1748.

8. PRILOZI

Reagensi za određivanje fenolnih kiselina:

- 50 %-tni etanol (pripremiti razrjeđivanjem 96 %-tnog etanola koristeći se volumnim postotcima i pravilom zvijezde)
- 0,5 M HCl (titrival)
- nitrit-molibdatni reagens (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)

Reagens za određivanje treslovina:

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

Životopis

Melani Draganjac [REDACTED] Pohađala je Područnu školu Jarče polje, odnosno Osnovnu školu Netretić te zatim Gimnaziju Karlovac, gdje je upisala i završila smjer opće gimnazije. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije godine 2018. upisala je studij Kemijskog inženjerstva. Tijekom treće godine studija odradila je stručnu praksu u PPK mesnoj industriji u Karlovcu.

Završni rad pod naslovom „Ravnateža para-kapljevina u sustavu aceton – cikloheksan“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Marka Rogošića obranila je 17. rujna 2021.

Na XIV. susretu mladih kemijskih inženjera održanom 24. i 25. veljače 2022. sudjelovala je kao koautor s priopćenjem:

M. Draganjac, K. Zagajski Kučan, M. Rogošić: Modeliranje fazne ravnateže para-kapljevina u dvokomponentnome sustavu aceton – cikloheksan, Knjiga sažetaka, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2022, str. 90.