

# Izolacija antioksidativnih sastavnica biljke *Medicago sativa* L. primjenom ciklodekstrina

---

Šimić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:522369>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Sara Šimić**

**Izolacija antioksidativnih sastavnica biljke  
*Medicago sativa L.* primjenom ciklodestrina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju te Zavodu za farmakognoziiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Maria Juga.

Zahvaljujem se dr. sc. Mariju Jugu na mentorstvu i iskazanom povjerenju. Također se zahvaljujem dr. sc. Marijani Zovko Končić koja mi je omogućila korištenje resursa potrebnih za provođenje eksperimenata u laboratoriju Zavoda za farmakognoziiju. Posebno se zahvaljujem kolegici mag. pharm. Barbari Fumić na beskrajnom strpljenju i velikodušnoj pomoći, korisnim savjetima i diskusijama tijekom izrade diplomskog rada.

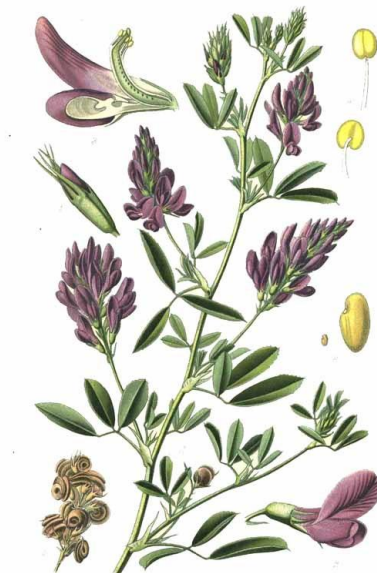
# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. VRSTA MEDICAGO SATIVA L, FABACEAE .....	1
1.2. POLIFENOLI .....	3
1.2.1. Flavonoidi .....	4
1.2.2. Fenolne kiseline.....	5
1.3. CIKLODEKSTRINI .....	7
1.4. OKSIDATIVNI STRES.....	9
1.5. LIOFILIZACIJA.....	12
1.6. KVALITETA KONAČNOG PRODUKTA OSIGURANA DIZAJNOM EKSPERIMENTA (ENG. QUALITY BY DESIGN)...	15
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE .....	18
3.1.1. Biljni materijal .....	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Uređaji i software.....	18
3.2. METODE ISPITIVANJA .....	19
3.2.1. Eksperimentalni dizajn .....	19
3.2.2. Izrada ekstrakata.....	19
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola .....	20
3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida .....	21
3.2.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	22
3.2.6. Određivanje kelirajuće aktivnosti.....	22
3.2.7. Određivanje antiradikalne aktivnosti .....	23
3.2.8. Liofilizacija.....	24
3.2.9. Statistička obrada podataka .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>
4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA KOLIČINU FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST ....	25
4.2. ODREĐIVANJE KOLIČINE POLIFENOLA .....	28
4.3. ODREĐIVANJE KOLIČINE FLAVONOIDA .....	30
4.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH KISELINA .....	32
4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	34
4.5.1. Antiradikalna aktivnost .....	34
4.5.2. Kelirajuća aktivnost .....	35
4.6. UTJECAJ PROCESA LIOFILIZACIJE NA KOLIČINU FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST .....	37
4.7. OPTIMIZACIJA UVJETA EKSTRAKCIJE .....	40
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>45</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>46</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Vrsta *Medicago sativa* L, Fabaceae

*Medicago sativa*, znana kao lucerna, višegodišnja je cvjetnica zelenih listova i ljubičastih cvjetova koja raste do visine od 1 m. Cvjeta od lipnja do srpnja, a sjemenke dozrijevaju od srpnja do rujna. Cvjetovi su hermafroditi (imaju muške i ženske spolne organe) te se oprašuju pčelama, leptirima ili se samooprašuju. Pogodna je za rast na lakom (pjeskovitom), srednjem (ilovači) ili teškom (glini) tlu. Može rasti na tlima siromašnim nutrijentima, ali ne može rasti u sjeni. Kao droga se upotrebljavaju listovi, sjemenke, ulje ([www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)).



Slika 1. *Medicago sativa* L, Fabaceae

Lucerna je jedna od najvažnijih znanih ljekovitih biljaka zbog velikog sadržaja različitih fitokemijskih komponenti koje imaju povoljan fiziološki učinak na organizam. Najvažnije bioaktivne komponente su škrob, ugljikohidrati, bazični proteini (histoni, L-lizin, L-arginin, aspartinska i glutaminska kiselina) te neproteinska aminokiselina L-kanaverin. U velikoj količini prisutni su polifenoli, flavonoidi, saponini, alkaloidi, tanini, lignin, pektini, amini, karotenoidi, purinske baze, biljni steroli, fitoestrogeni (kumestrol). Lucerna je izvanredan izvor vitamina A, D, E, K, B6, C i U. Sadrži i razne enzime, hormone, protuupalne supstancije te minerale u tragovima (Ca, Mg, Zn, K, P, Fe). Sastojci lucerne koriste se svježi, kako bi se zadržale bitne hranjive tvari potrebne za normalno funkcioniranje cijelog organizma (Caunii i sur., 2012).

Lucerna nalazi široku primjenu u ljekovite svrhe, ne samo kod ljudi nego i kod životinja. Ima antimikrobno, protuupalno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje zbog prisutnosti fenolnih i flavonoidnih komponenti koje se ponašaju kao hvatači slobodnih radikala i kelatori metala (Karimi i sur., 2013). Zbog velikog udjela antioksidativnih tvari odgađa proces starenja, štiti od infekcije te prevenira koronarne srčane bolesti. Smatra se da jača imunitet, detoksicira organizam (zbog sadržaja pektina, enzima, vitamina i minerala), pomaže obnovu stanica, obnavlja želučani i probavni sustav te da je učinkovita u prevenciji retencije vode u organizmu (Caunii i sur., 2012).

Prema istraživanju provedenom na miševima, pokazano je da *M. sativa* ublažava cerebralna oštećenja i stres te usporava progresiju gubitka kratkotrajnog pamćenja i motoričke diskoordinacije. Te aktivnosti proizlaze iz antioksidativnog učinka kojim se uklanjaju slobodni radikali jer se inhibira pretvorba ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu koja je odgovorna za stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva čija je koncentracija tijekom cerebralne ishemije povećana (Bora i Sharma, 2011).

FDA savjetuje da djeca, starije osobe i osobe s kompromitiranim imunološkim sustavom trebaju izbjegavati konzumaciju klica lucerne zbog moguće bakterijske kontaminacije. Potrebno je izbjegavati upotrebu tijekom trudnoće i dojenja, te kod karcinoma osjetljivih na estrogenske hormone. Nepoželjna je istovremena primjena s varfarinom jer sadrži vitamin K koji antagonizira antikoagulacijski učinak i s kortikosteroidima jer ometa njihov imunosupresivni učinak ([www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)).

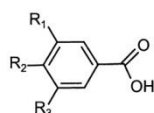
Unatoč brojnim pozitivnim učincima, potreban je oprez jer se pokazalo da L-kanavanin i kumestrol uzrokuju toksične učinke, stoga je preporučljivo prije upotrebe ukloniti te komponente iz biljke. L-kanavanin je strukturni analog argininu (može se inkorporirati u protein ili ometati vezanje arginina za enzim), povezan sa sistemskim lupusom sličnim eritematoznom zbog promjena u crvenim krvnim stanicama koje uzrokuje (Bora i Sharma, 2011).

## 1.2. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti, koji su kao bioaktivni biljni produkti uključeni u različite procese poput rezistencije na patogene i zaštite od UV zračenja (Manach i sur., 2004). Zbog prisutnosti fenolne skupine mogu stupati u reakcije sa slobodnim radikalima i pri tome smanjiti njihov negativan utjecaj. Polifenoli su najzastupljenija skupina antioksidansa u hrani, za čiju je antioksidativnu aktivnost zaslužan njihov redoks potencijal, pri čemu djeluju kao donori vodikovog atoma (Amarowicz i sur, 2004).

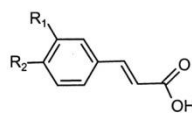
Polifenoli su vrlo zastupljeni u biljnom svijetu. Mogu se klasificirati u različite skupine prema broju fenolnih prstenova i strukturoj poveznici između dva prstena. S obzirom na strukturne karakteristike razlikujemo fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, lignane. (Slika 2) (Manach i sur., 2004). Suvremena istraživanja potvrđuju veliki doprinos polifenola u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka, osteoporoze te podupiru njihovu ulogu u prevenciji neurodegenerativnih bolesti i dijabetes mellitus-a (Scalbert i sur., 2005).

### Hydroxybenzoic acids



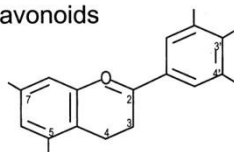
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$  : Protocatechuic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Gallic acid

### Hydroxycinnamic acids

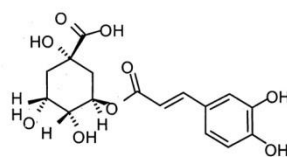


$R_1 = OH$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Caffeic acid  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$  : Ferulic acid

### Flavonoids

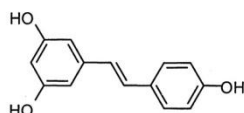


See Figure 2



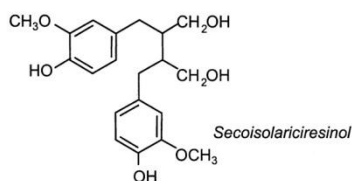
Chlorogenic acid

### Stilbenes



Resveratrol

### Lignans



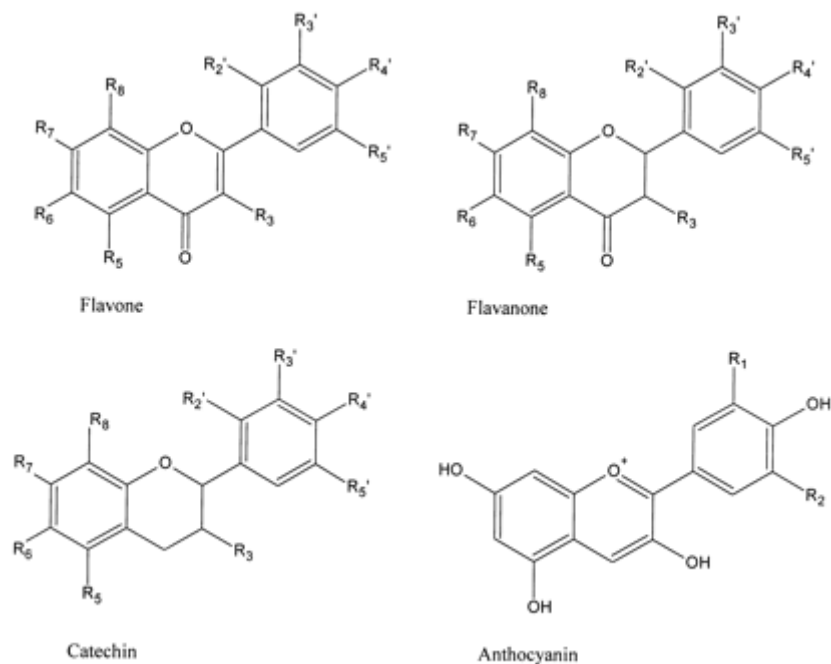
Secoisolariciresinol

Slika 2. Strukturna klasifikacija polifenola

### 1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju skupini prirodnih spojeva s varijabilnim fenolnim strukturama te su pronađeni u voću, povrću, žitaricama, korijenju, stabljikama, cvijeću, čaju i vinu. Ovi prirodni proizvodi poznati su po svojim blagotvornim učincima na zdravlje mnogo prije nego što su flavonoidi izolirani kao učinkovite komponente (Nijveldt i sur., 2001).

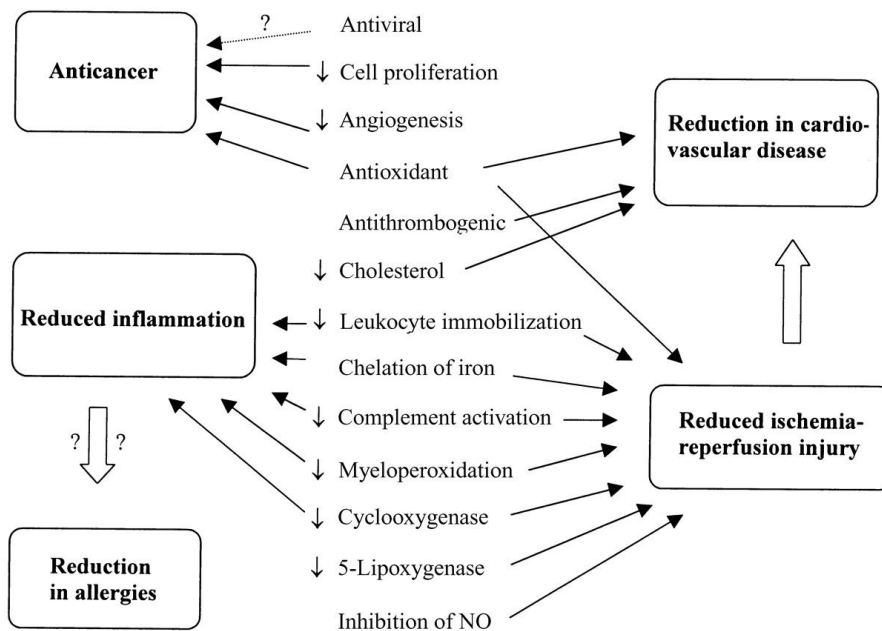
Flavonoidi su spojevi koji imaju strukturu tipa C6-C3-C6 (dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem). U većini flavonoida središnji fragment povezan je s kisikom u heterociklični prsten. Raznolikost njihove strukture uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličnog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. Na osnovi njihove molekularne strukture mogu se podijeliti u različite razrede (Slika 3).



Slika 3. Molekulske strukture glavnih razreda flavonoida

In vitro eksperimentalni sustavi pokazali su da flavonoidi posjeduju antialergijska, antivirusna, antiinflamatorna, antiaterosklerotska i antikarcinogena svojstva (Slika 4).





Slika 4. Hipoteza o povezanosti radnih mehanizama flavonoida i njihovih učinaka na bolesti.

Međutim, najveći interes usmjeren je prema antioksidativnoj aktivnosti flavonoida zbog njihove sposobnosti da reduciraju stvaranje slobodnih radikala ili da ih hvataju. Flavonoidi stabiliziraju reaktivne kisikove vrste reagirajući s aktivnom komponentom radikala. Zbog visoke reaktivnosti hidroksilne skupine flavonoida, radikali postaju neaktivni, prema sljedećoj jednadžbi:  $flavonoid(OH) + R^{\cdot} \rightarrow flavonoid(O^{\cdot}) + RH$ , gdje je  $R^{\cdot}$  slobodni radikal, a  $O^{\cdot}$  slobodni kisikov radikal. (Nijveldt i sur., 2001).

### 1.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su aromatski sekundarni biljni metaboliti, raširene u cijelom biljnom carstvu. Najnoviji interes za fenolne kiselina proizlazi iz njihove potencijalne zaštitne uloge od oksidativnog oštećenja koja dovode do razvoja različitih bolesti (bolesti srčanog mišića, moždanog udara, i raka) kroz konzumiranje voća i povrća. (Robbins, 2003.)

Pojam "fenolne kiseline", općenito opisuje fenole koji posjeduju jednu karboksilnu funkcionalnu skupinu (npr. salicilna kiselina). Međutim, kada se opisuju biljni metaboliti, to se odnosi na zasebne skupine organskih kiselina (Tablica 1).

R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	X	code	common name
H	H	H	H	a	1	cinnamic acid
-OH	H	H	H	a	2	<i>o</i> -coumaric acid
H	H	-OH	H	a	3	<i>p</i> -coumaric acid
H	-OH	H	H	a	4	<i>m</i> -coumaric acid
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	a	5	ferulic acid
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	a	6	sinapic acid
H	-OH	-OH	H	a	7	caffeic acid
H	H	H	H	b	8	benzoic acid
-OH	H	H	H	b	9	salicylic acid
H	H	-OH	H	b	10	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	b	11	vanillic acid
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	b	12	syringic acid
H	-OH	-OH	H	b	13	protocatechuic acid
-OH	H	H	-OH	b	14	gentisic acid
-OH	-OH	-OH	-OH	b	15	gallic acid
H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	H	b	16	veratric acid
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	c	17	syringaldehyde
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	c	18	vanillin

Tablica 1. Strukture istaknutih fenolnih kiselina u biljnim drogama

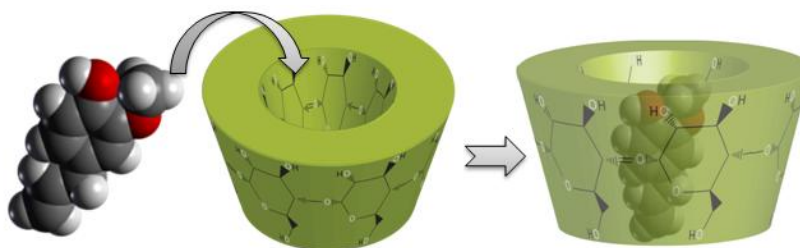
U prirodi se pojavljuju fenolne kiseline koje sadrže dva različita konstitutivna ugljikova kostura: hidroksicinaminsku (Xa) i hidroksibenzojevu (Xb) strukturu. Osnovnu strukturu hidroksibenzojevih kiselina predstavlja C6-C1 jedinica, a hidroksicimetnih kiselina C6-C3 jedinica. Premda osnovni kostur ostaje isti, broj i položaj hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu stvara veliku raznolikost. U mnogim slučajevima, aldehidni analozi (Xc) također su uvršteni u skupinu fenolnih kiselina (npr. vanilin). Kavena, *p*-kumarinska, vanilinska, ferulična i protokateinska kiselina prisutne su u gotovo svim biljkama. Druge kiseline se nalaze u odabranim hrane ili biljaka (npr. gentizinska kiselina). (Robbins, 2003.)

### 1.3. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi građeni od glukopiranoznih monomera međusobno vezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom. Raspored monomera u molekuli ciklodekstrina je takav da se može vizualizirati kao prsten, cilindar ili, točnije, kao krnji stožac s centralnom šupljinom. Zbog rigidne prirode cikličke strukture molekule ciklodekstrina primarne i sekundarne hidroksilne skupine nalaze se na suprotnim stranama šupljine, dok unutarnje zidove CD-a tvori hidrofobna okosnica ugljika glukopiranoznih monomera, što čini centralnu šupljinu nešto hidrofobnijom od vanjske površine. Takva građa odgovorna je za hidrofilna svojstva vanjskog dijela molekule i relativno dobru topljivost ciklodekstrina u vodi te za lipofilni karakter šupljine i sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa s brojnim hidrofobnim molekulama (Szejtli, 1998).

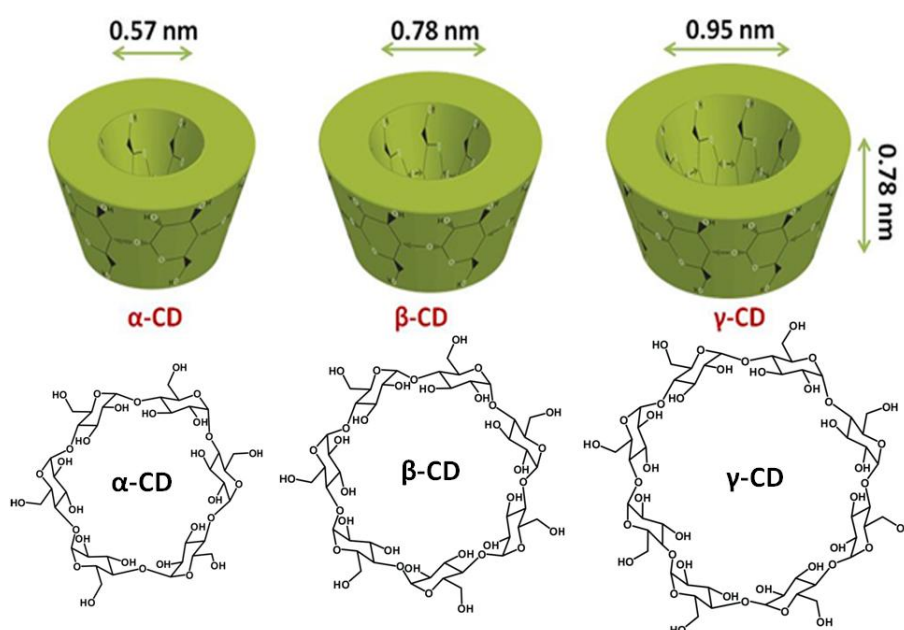
CD inkluzijski kompleksi su molekularni kompleksi karakterizirani zarobljavanjem lipofilne molekule lijeka ili lipofilne skupine slabo vodo-topljivog lijeka u hidrofobnoj centralnoj šupljini ciklodekstrina (Slika 5). Proces stvaranja CD kompleksa ( $D_mCD_n$ ) je gotovo uvijek reverzibilan, naročito u vodenim otopinama gdje postoji stalna i brza izmjena molekule lijeka između vezanog i nevezanog oblika:  $(D_mCD_n): m \cdot D + n \cdot CD \xrightleftharpoons{K_{m:n}} D_mCD_n$ , gdje se  $m$  molekula lijeka (D) asocira s  $n$  molekula CD kako bi se stvorio kompleks stehiometrije  $m:n$ .  $K_{m:n}$  je konstanta stabilnosti kompleksa, izražava se na sljedeći način:  $K_{m:n} = \frac{[D_mCD_n]}{[D]^m \cdot [CD]^n}$ ; gdje zagrade označavaju molarne koncentracije.

Pokretačke sile odgovorne za formiranje kompleksa su elektrostatske interakcije, van der Waalsove veze, vodikove veze, otpuštanje konformacijskog napreznja te interakcije prijenosa naboja (Brewster and Loftsson, 2007).



Slika 5. Formiranje inkluzijskog kompleksa

Sirovina za proizvodnju ciklodekstrina je lako dostupan ugljikohidratni polimer škrob. Razgradnjom škroba uz enzim ciklomaltodekstrin glukanotferazi (CGT), kojeg prirodno proizvodi *Bacillus macerans* i neke druge vrste, nastaje smjesa  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ciklodekstrina (redom građeni od 6, 7 i 8 glukopiranoznih monomera )(Slika 6). Moguće je usmjeriti sintezu prema željenom derivatu dodatkom nekih tvari te kontrolom pH i temperature reakcijskog medija. Dodatkom toluena u reakcijsku smjesu uglavnom nastaje  $\beta$ -CD koji s toluenom tvori netopljivi kompleks te tako pomiče ravnotežu reakcije u smjeru nastajanja  $\beta$ -CD. Na analogan način, dodatkom dekana u reakcijsku smjesu preferirano nastajaje  $\alpha$ -CD, a dodatkom  $\alpha$ -naftola i metiletiketona nastaje  $\gamma$ -CD (Frömming and Szejtli, 1994).

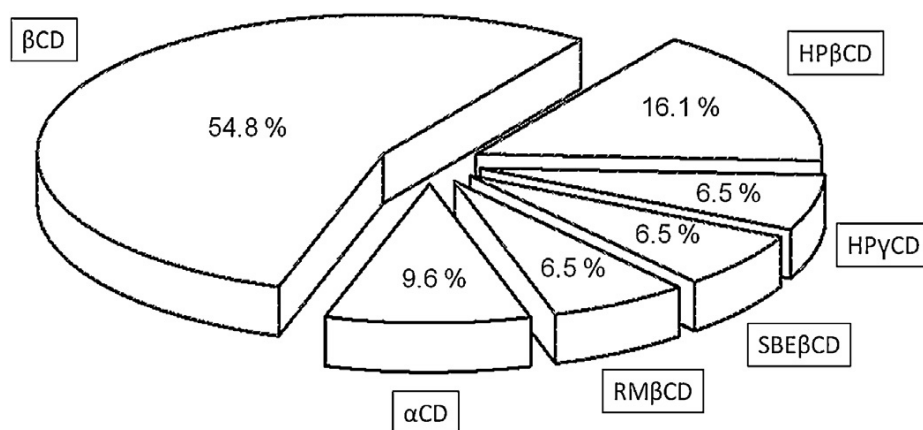


Slika 6. Struktura prirodnih ciklodekstrina

Danas se zbog veličine centralne šupljine, jednostavnog načina dobivanja i ekonomskih razloga najčešće upotrebljava  $\beta$ -CD (Slika 7). Nedostatak  $\beta$ -CD je ograničena topljivost u vodi zbog koje s lipofilnim lijekovima često tvori teško topljive komplekse. Niska topljivost  $\beta$ -CD na sobnoj temperaturi posljedica je vrlo jakih vodikovih veza unutar molekule ciklodekstrina. Supstitucijom hidroksilnih skupina koje sudjeluju u nastajanju vodikovih veza, čak i s lipofilnim supstituentima (metilna skupina), može se znatno povećati topljivost  $\beta$ -CD. Ostali derivati ciklodekstrina interesantni za farmaceutsku primjenu su hidroksipropilni derivati  $\alpha$ - i  $\gamma$ - ciklodekstrina te sulfoalkileterski derivati kao što je sulfobutileter- $\beta$ -ciklodekstrin, alkilirani ciklodekstrini kao što je djelomično metilirani- $\beta$ -ciklodekstrin i razni razgranati ciklodekstrini kao što su glukozil- i maltozil-  $\beta$ -ciklodekstrin. Određeni derivati,

kao što su 2-hidroksipropil (HP $\beta$ CD i HP $\gamma$ CD) i sulfobutileter (SBE $\beta$ CD), posjeduju poboljšane toksikološke profile u usporedbi sa samim ciklodekstrinima (Brewster and Loftsson, 2007).

Ciklodekstrini su praktički netoksični zbog slabe apsorpcije iz probavnog trakta. Razne studije su pokazale da nakon peroralne primjene velikih doza nije određena LD50 niti kod jedne od životinjskih vrsta (miševi, štakori, psi) obuhvaćenih nizom ispitivanja (Irie and Uekama, 1997).

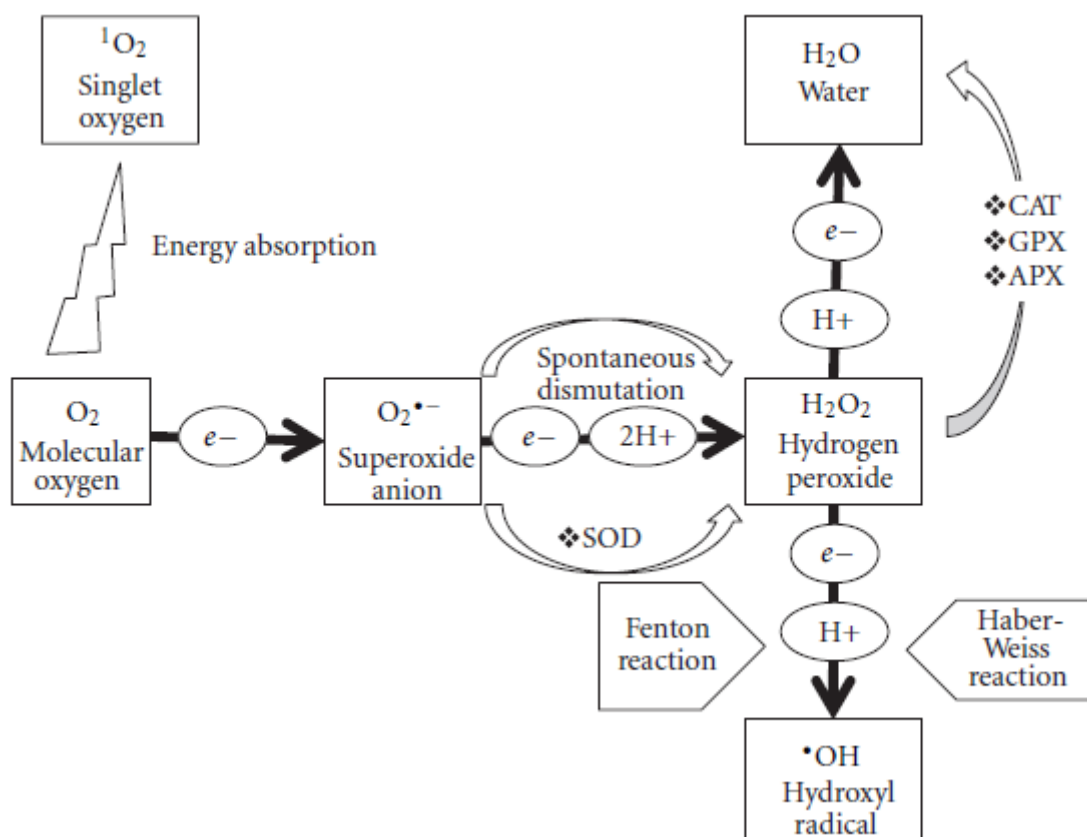


Slika 7. Relativna zastupljenost ciklodekstrina u farmaceutskim oblicima lijekova dostupnim na tržištu.

Najvažnije prednosti ciklodekstrina kao nosača lijekova su definirana kemijska struktura s mogućnošću kemijske modifikacije, raspoloživost ciklodekstrina različitih fizičko-kemijskih svojstava i različitih veličina centralne šupljine, neznatna toksičnost i niska farmakološka aktivnost, topljivost u vodi, te zaštita lijeka inkluzijskim kompleksima ili konjugatima od biorazgradnje. Kombinacijom ciklodekstrinskih kompleksa i drugih pomoćnih tvari moguće je učinkovito optimirati oslobađanje lijeka. S obzirom na ta saznanja ciklodekstrini imaju važnu ulogu u pripremi naprednih farmaceutskih oblika (Jug i Bećirević-Laćan, 2002).

#### 1.4. Oksidativni stres

Neizbježna posljedica aerobnog metabolizma je proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS). ROS uključuje slobodne radikale kao što su superoksid anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroksilni radikal (•OH) i ne-radikalne molekule poput vodik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singleta kisika (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), itd (Slika 8).

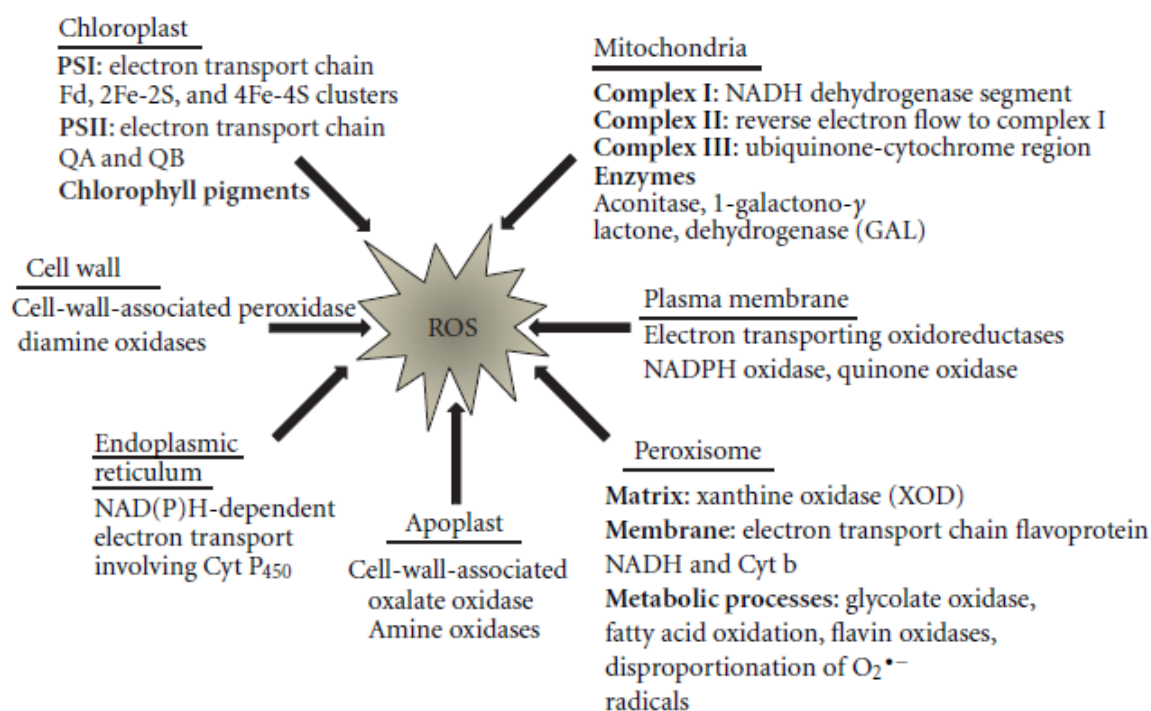


Slika 8. Shematski prikaz nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u biljkama.

Postoje dva različita mehanizma aktivacije  $O_2$  pri čemu dolazi do proizvodnje visoko reaktivnog ROS. Stupnjevita redukcija molekularnog kisika  $O_2$  dovodi do formiranja  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , te  $\bullet OH$ , a izlaganjem  $O_2$  visokim energijama nastaje  $^1O_2$  (Slika 8).

U fiziološkim uvjetima, najučestaliji slobodni radikal kisika je superoksidni anion.  $O_2^{\bullet-}$  je jednostavno detoksificirati do  $H_2O_2$  bilo neenzimskom ili enzimskom reakcijom kataliziranom superoksid dismutazom (SOD).  $H_2O_2$  se prevodi u  $H_2O$  uz pomoć enzima katalaze (CAT), gvajakol peroksidaze (GPX) i askorbat peroksidaze (APX). Neuravnoteženost u koncentracijama  $O_2^{\bullet-}$  i  $H_2O_2$  može rezultirati formiranjem znatno opasnijeg  $\bullet OH$ . Hidroksilni ion stupa u interakciju sa bilo kojom biološkom molekulom u blizini i naknadno uzrokuje stanične štete, kao što su lipidne peroksidacije, oštećenja proteina, i uništavanje membrana. Budući da stanice nemaju enzimski mehanizam uklanjanja  $\bullet OH$ , višak njegove proizvodnje može dovesti do smrti stanice.

U biljkama, ROS uvijek nastaje uz neizbježno istjecanje elektrona na  $O_2$  tijekom transporta elektrona enzimima respiratornog lanca ili kao nusprodukt različitih metaboličkih putova lokaliziranih u različitim staničnim odjeljcima (Slika 9).



Slika 9. Mjesta proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u biljkama

U normalnim uvjetima rasta, produkcija ROS-a u stanicama je mala. ROS u niskim koncentracijama ima ulogu signalizirajuće molekule, upozorava stanicu o mogućim oksidativnim oštećenjima i zato ih ne uklanjamo iz organizma u potpunosti.

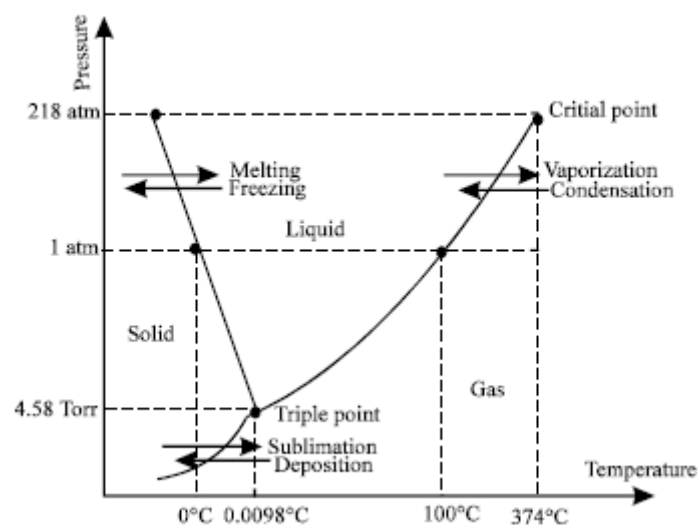
Nepovoljni uvjeti iz okoline poput suše, slanosti, hladnoće, metalne toksičnosti, UV-B zračenja i napada patogena mogu dovesti do pojačanog stvaranja ROS-a u biljkama zbog poremećaja stanične homeostaze. Svi ROS su iznimno štetni za organizme u visokim koncentracijama. Kad razina ROS-a prelazi obrambene mehanizme, kaže se da je stanica u stanju "oksidativnog stresa." Oksidativni stres uzrokovan je poremećajem ravnoteže između stvaranja i eliminacije ROS-a. Pojačana proizvodnja ROS-a inducirana nepovoljnim uvjetima okoline predstavlja prijetnju stanicama te može uzrokovati peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina, oštećenje nukleinske kiseline, enzima, aktiviranje programirane stanične smrti i na kraju dovesti do smrti stanica. Eliminacija i detoksikacija viška ROS postiže se učinkovitim antioksidativnim sustavom koji se sastoji od neenzimskih i enzimske antioksidansa. Enzimski antioksidansi su superoksidismutaze (SOD), katalaze (CAT), gvajakol peroksidaze (GPX), enzimi askorbatglutation ciklusa (ASA-GSH), kao što su askorbat peroksidaze (APX), monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) i glutacion

reduktaze (GR). Askorbat (vitamin C), glutation (GSH), karotenoidi, tokoferoli (vitamin E) i fenoli služe kao moćni neenzimski antioksidansi unutar stanice. (Sharma, 2012.)

## 1.5. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem uključuje uklanjanje vode ili drugog otapala iz pripravka, procesom sublimacije. Sublimacija se događa kada se zamrznuta tekućina izravno prevodi u plinovito stanje bez prolaska kroz tekuću fazu. Nasuprot tome, sušenje na sobnoj temperaturi obično rezultira nekim promjenama u pripravku (promjena kristalnog oblika i sl.), što nije pogodno samo za sve materijale. Pojam "lioofilizacije" opisuje postupak za proizvodnju proizvoda koji "voli suho stanje". Liofilizacija se uglavnom koristi za uklanjanje vode iz osjetljivih proizvoda, većinom biološkog podrijetla koji su termolabilni ili na neki drugi način nestabilni u vodenoj otopini za vrijeme duljeg skladištenja. Prilikom liofilizacije ne dolazi do njihovog oštećenja, pa osjetljivi proizvodi mogu biti sačuvani u trajno stanje koje se može lako pohraniti i jednostavno rekonstituirati dodavanjem vode. Primjeri liofiliziranih proizvoda su: antibiotici, bakterije, cjepiva, vitamini, hormoni, dijagnostici, proizvodi koji sadrže proteine, stanice i tkiva.

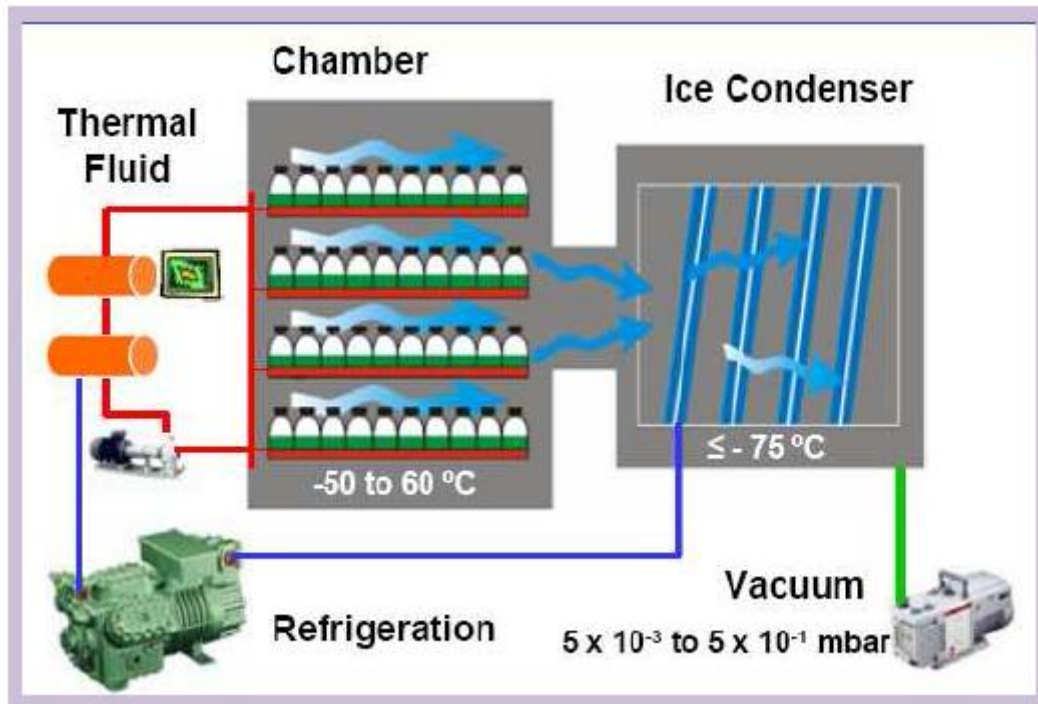
Liofilizacija se izvodi na temperaturi i tlaku ispod trojne točke, kako bi se omogućila sublimacija leda. Trojna točka je karakteristika svake supstancije. U trojnoj su točki sva tri agregatna stanja u ravnoteži (Slika 10). Kako se cijeli postupak provodi na niskoj temperaturi i tlaku, pogodan je za sušenje termolabilnih spojeva.



Slika 10. Ovisnost parcijalnog tlaka vodene pare o temperaturi. Prijelazi između agregatnih stanja

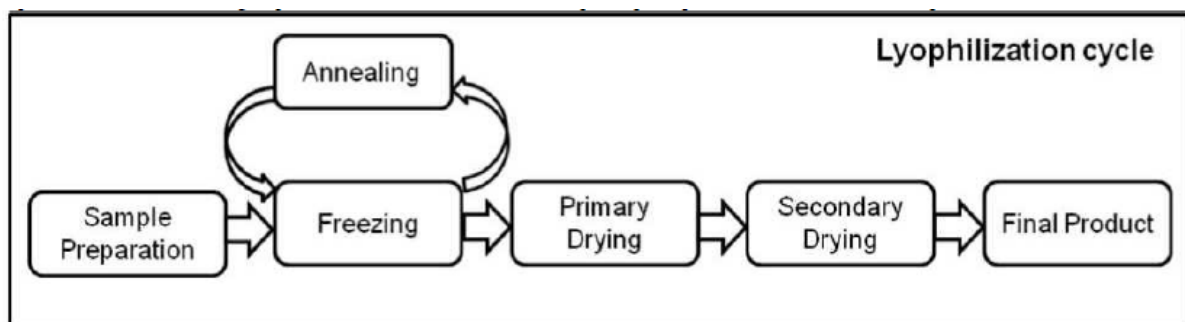


Liofilizator se sastoji od komore za sušenje (police ili držači tikvica), vakuum pumpe koja služi za smanjuje tlak zraka okoline u komori za sušenje i kondenzatora koji uklanja vlagu kondenzacijom na hladnoj površini (- 40 do - 80°C) (Slika 11).



Slika 11. Dizajn liofilizatora

Koraci uključeni u liofilizaciju započinju pripravom otopine uzorka nakon čega slijede zamrzavanje, primarno i sekundarno sušenje, da se dobije konačni osušeni produkt uz željeni sadržaj vlage (Slika 12).



Slika 12. Koraci u liofillizacijskom ciklusu

Vlažna tvar ili njezina otopina smrzne se uz sniženi tlak pri niskoj temperaturi u liofilizatoru. Većina uzoraka koji se suše smrzavanjem su eutektične smjese, to su mješavine tvari koje se zamrzavaju na nižoj temperaturi od okolne vode. Zato je vrlo važno da se proizvod prethodno zamrzne ispod te eutektičke temperature.

Gradijent koncentracije vodene pare između komore za sušenje i kondenzatora je pokretačka sila za uklanjanje vode tijekom liofilizacije. Tlak pare vode raste s povećanjem temperature tijekom primarnog sušenja. Prema tome, temperatura primarnog sušenja treba biti što je moguće viša, ali ispod kritične temperature procesa, kako bi se izbjegao gubitak strukture. Određivanje kritične temperature proizvoda važan je korak u optimizaciji liofilizacije. Ova kritična temperatura određuje maksimalnu temperaturu koju proizvod može izdržati tijekom primarnog sušenja bez da otopi ili uništi. Smrznuti proizvodi mogu biti kategorizirani kao kristalni ili amorfni spojevi. Kristalni proizvodi imaju dobro definiranu "eutektičnu" točku taljenja (najnižu temperaturu tališta), dok amorfni proizvodi imaju odgovarajuću temperaturu "staklastog prijelaza" ( $T_g$ ) te se puno teže liofiliziraju.

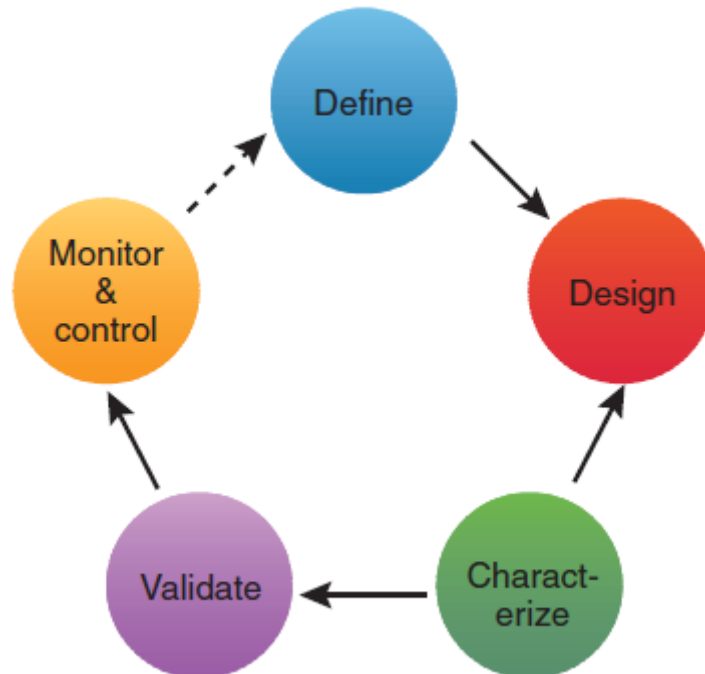
Sekundarno sušenje zagrijavanjem je opcionalan korak, povremeno korišten, kako bi se uklonila heterogenost pri zamrzavanju i kako bi se smanjilo vrijeme primarnog sušenja. Primarnim sušenjem, led nastao za vrijeme zamrzavanja ukloni se sublimacijom u vakuumu pri niskim temperaturama. Ostaje vrlo porozna struktura preostale amorfne otopljene tvari koja obično sadrži do 30% vode. Sekundarnim sušenjem, većina preostale vode desorbira kako se temperatura uzoraka postupno povećava uz zadržavanje niskog tlaka. U idealnom slučaju konačni produkt je suh, lako rekonstituibilan prašak velike površine.

Oko 50% trenutnih biofarmaceutika su liofilizirani pripravci, što predstavlja liofilizaciju kao najčešću strategiju formuliranja. U liofiliziranom čvrstom stanju, kemijske ili fizičke reakcije razgradnje se inhibiraju ili dovoljno uspore, što rezultira poboljšanom dugoročnom stabilnošću. Osim bolje stabilnosti, liofilizirani pripravci također pružaju jednostavno rukovanje tijekom transporta i skladištenja. Svijest o složenosti procesa smrzavanja, njegovim posljedicama na kvalitetu proizvoda i procesa izvedbe bitna je za uspješnost liofilizacije. (Lavakumar et al., 2013.)

## 1.6. Kvaliteta konačnog produkta osigurana dizajnom eksperimenta (eng. quality by design, QBD)

Cilj farmaceutskog razvoja je dizajnirati kvalitetan proizvod i proizvodni proces kako bi se postigli zadani standardi kvalitete.

QbD je sustavni pristup razvoju koji počinje s unaprijed definiranim ciljevima kako bi se dizajnirala formulacija proizvoda i proces koji će zadovoljiti željene attribute, ističe razumijevanje proizvoda i proizvodnog procesa, kontrolu procesa i kvalitetno upravljanje rizicima. Kao rezultat svog tog znanja, moguće je kontinuirano pratiti proizvod i ažurirati proizvodni proces kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda. To se može vidjeti na slici 13 koja ilustrira različite faze tijekom životnog ciklusa farmaceutskog procesa: definiranje, dizajniranje, karakteriziranje, validiranje, nadziranje i kontroliranje. Konačna veza između "nadziranja i kontroliranja" i "definiranja" predstavlja procesne promjene koje su pokrenute zbog mogućnosti poboljšanja procesa utvrđenih tijekom nadzora procesa ili na neki drugi način uvedene kako bi poboljšali izvođenje procesa i robusnost.



Slika 13. Različiti koraci u razvoju farmaceutskog proizvoda

FDA smatra QbD kao „izgradnju kvalitete konačnog proizvoda pomoću razumijevanja i kontroliranja formulacije i proizvodnih varijabli, a testiranje se koristi za potvrdu kvalitete proizvoda“.

QbD je proces koji se u osnovi sastoji od 4 koraka: definiranja ciljnog profila proizvoda (QTPP), procjene rizika, dizajna pokusa i strategije kontrole.

Profil ciljane kvalitete proizvoda (QTPP): opisuje kriterije dizajna proizvoda, omogućuje razumijevanje onoga što će osigurati kvalitetu, sigurnost i učinkovitost proizvoda, te će poslužiti kao osnova za utvrđivanje kritičnih svojstava kvalitete (engl. Critical Quality Attributes, CQA), kritični procesni parametri (engl. Critical Process Parameters, CPP) i strategije kontrole.

Procjena rizika završne formulacije i procesa temelji se na poznavanju materijala i postupaka koji se koriste za razvoj proizvoda i obavezno se dokumentira, što olakšava kontrolu procesa. Dizajn pokusa uključuje eksperimentalno planiranje i dokumentiranje, izvršenje pokusa i analizu podataka. Projektiranje eksperimenta je strukturirana, organizirana metoda za određivanje odnosa između kontroliranih čimbenika koji utječu na formulaciju ili korake procesa i izlaznih varijabli tog procesa. Tijekom dizajna pokusa manipuliramo kontrolnim čimbenicima (nezavisne varijable) na različitim razinama kako bi vidjeli njihov utjecaj na odabrane odgovore (zavisne varijable). (Rathore & Winkle, 2009.)

Dakle, eksperimentalni dizajn je strategija upravljanja eksperimentima kojom je moguće dobiti informacije s maksimalnom preciznošću i efikasnošću uz minimalan broj pokusa.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Lucerna (*Medicago sativa* L.) je biljka bogata polifenolima za koje se pokazalo da su izvrsni antioksidansi. Zbog spoznaja o štetnom utjecaju slobodnih radikala na organizam i njihovoj ulozi u razvoju brojnih bolesti, u posljednje vrijeme povećan je interes za biljke bogate fenolnim spojevima, s ciljem pronalaska sredstava za prevenciju i liječenje bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom. Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka najčešće su korištena organska otapala koja negativno utječu na okoliš i ljude. Stoga je cilj ovog diplomskog rada optimizirati uvjete ekstrakcije fenolnih komponenti iz vrste *Medicago sativa* korištenjem vodene otopine hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina. Koristit će se program za statističko planiranje eksperimenta kako bi usporedili utjecaj različitih procesnih parametara na učinkovitost ekstrakcije. Vodeni ekstrakti podložni su mikrobiološkoj kontaminaciji i gubitku antioksidativnih svojstava, zbog toga su pripremljeni kompleksi u čvrstom stanju postupkom liofilizacije. Kako bi se utvrdila učinkovitost liofilizacije u očuvanju antioksidativnih svojstava dobivenih ekstrakata, provedena je usporedba antioksidativnog djelovanja tekućih i liofiliziranih ekstrakata.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali za ispitivanje**

##### **3.1.1. Biljni materijal**

Osušena, usitnjena zelen biljne vrste *Medicago Sativa L., Fabaceae*

##### **3.1.2. Kemikalije**

U ispitivanjima su korišteni: destilirana voda, metanol, etanol (T.T.T. Njemačka); galna kiselina monohidrat, nitrit-molibdat reagens (MP Biomedicals Inc.,SAD); aluminijev klorid heksahidrat, željezov (II) sulfat heptahidrat, kloroform (Kemika,Zagreb); Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Njemačka); natrijev karbonat (Sigma Aldrich, SAD); klorovodična kiselina (Poch, Poljska); natrijev hidroksid (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb); ferozin (Fluka, SAD); kavena kiselina, kvercetin dihidrat, tert-butil-4-hidroksianisol (BHA), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), hidroksiipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (Wacker Chemie GmbH.).

##### **3.1.3. Uređaji i software**

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala (UD Corporation, SAD); centrifuga (Tehtnica železniki, Slovenija); vodena kupelj, inkubator (INKO, Zagreb); sušionik (Instrumentaria, Zagreb); precizna analitička vaga za vaganje biljnog materijala (Mettler Toledo, Švicarska); ultrazvučna kupelj za ekstrakciju (Sonorex digital 10P, Bandelin electronic, Njemačka); automatske jednokanalne i višekanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Eppendorf, Njemačka); UV/VIS spektrofotometar za mjerenje apsorbancije (Perkin elmer, SAD); čitač mikrotitarskih pločica (Awareness technology Inc., SAD); rotavapor (Büchi, Njemačka), pumpa za aeriranje (Elite 799, Rolf C. Hagen Corp.,SAD), liofilizator (Christ  $\alpha$  1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka).

Dizajn eksperimenata proveden je pomoću programa Design Expert 8.0 (Stat-Ease, Inc.).

## **3.2. Metode ispitivanja**

### **3.2.1. Eksperimentalni dizajn**

Ispitivan je utjecaj modifikacije ulaznih varijabli (koncentracija ciklodekstrina, vrijeme ekstrakcije, jačina ultrazvuka u ultrazvučnoj kupelji za ekstrakciju) na uspješnost ekstrakcije. Izlazne varijable su koncentracija polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina te antiradikalna i kelirajuća aktivnost prije i nakon liofilizacije. Parametri su analizirani metodom površine odgovora (eng. *response surface*) uz uporabu Box Behnken dizajna. Analizirano je 17 uzoraka kako bi se odredili optimalni uvjeti za ekstrakciju.

### **3.2.2. Izrada ekstrakata**

U Erlenmeyerovu tikvicu stavljeno je 2 g biljnog praha vrste *Medicago Sativa* i određena količina HP $\beta$ CD te dodano 25 ml ekstrakcijskog otapala (destilirana voda). Erlenmeyerove tikvice su zatvorene i stavljene u ultrazvučnu kupelj podešenu na temperaturu od 20°C i odgovarajuću jačinu ultrazvuka na određeno vrijeme. Željena temperatura u ultrazvučnoj kupelji održavana je dodatkom leda. Nakon ultrazvučne ekstrakcije, ekstrahirani sadržaj svake Erlenmeyerove tikvice filtriran je i prebačen u odmjernu tikvicu od 25 ml, te nadopunjen odgovarajućim otapalom do oznake. 15 ml tekućeg ekstrakta je prebačeno u kutijicu, smrznuto i podvrgnuto liofilizaciji, dok je ostatak prebačen u po 3 eppendorfice i pohranjen na tamno mjesto na temperaturu + 4 °C. Prije određivanja, ekstrakti su centrifugirani 10 minuta.

Prema predloženom dizajnu modifikacijom ulaznih varijabli priređeno je 17 ekstrakata. Ekstrakcijski uvjeti prikazani su u Tablici 2.

RUN	HP $\beta$ CD(mM)	T(min)	UZV strenght(%)
MS-1	25	15	80
MS-2	25	30	60
MS-3	15	30	80
MS-4	15	15	60
MS-5	5	30	100
MS-6	15	30	80
MS-7	25	45	80
MS-8	15	30	80
MS-9	5	30	60
MS-10	5	15	80
MS-11	5	45	80
MS-12	15	45	100
MS-13	25	30	100
MS-14	15	30	80
MS-15	15	30	80
MS-16	15	15	100
MS-17	15	45	60

Tablica 2. Ekstrakcijski uvjeti

### 3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola

Određivanje polifenolnih spojeva u ekstraktima provedeno je prema modificiranom propisu po Singeltonu (Singelton i sur., 1999).

Pripremljene su otopine galne kiseline (0.16 mg/ml), 10%-tna vodena otopina natrijevog karbonata i Folin-Ciocalteau reagens (razrijeđen s vodom u omjeru 1:3).

Za izradu baždarnog pravca priređene su otopine galne kiseline rastućih koncentracija. U jažice mikrotitarske pločice otpipetirano je po 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70  $\mu$ l otopine galne kiseline te nadopunjeno s vodom do 90  $\mu$ l. Zatim je dodano 90  $\mu$ l Folin-Ciocalteauovog reagensa i 90  $\mu$ l 10%-tne vodene otopine natrijeva karbonata.



U jažice je otpipetirano po 10 µl svakog ekstrakta (u triplikatu) i nadopunjeno do 90 µl s vodom. Dodano je 90 µl Folin-Ciocalteau reagensa i 90 µl 10%-tne vodene otopine natrijeva karbonata. Za svaki uzorak pripremljena je slijepa proba koja se sastojala od 10 µl ekstrakta te 260 µl destilirane vode.

Mikrotitarska pločica s uzorcima stajala je 1 sat u mraku pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 630 nm.

Količina ukupnih polifenola određena je pomoću baždarnog pravca galne kiseline.

Sadržaj ukupnih polifenola izražen je kao mg galne kiseline po ml uzorka.

#### **3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida**

Određivanje je rađeno prema modificiranom literaturnom propisu Kumazave i suradnika (Kumazava i sur., 2004).

Pripremljene su otopine 0.2% aluminijev klorid u metanolu i standard kvercetin dihidrat (0.2 mg/ml).

Za izradu baždarnog pravca priređene su metanolne otopine kvercetin dihidrata rastućih koncentracija. U jažice je otpipetirano 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 i 80 µl otopine kvercetin dihidrata i nadopunjeno s metanolom do 120 µl, te je još dodano 120 µl 0.2%-tne metanolne otopine aluminijevog klorida. Slijepa proba sadrži određene volumene kvercetin dihidratanadopunjene metanolom do 240 µl.

U jažice je otpipetirano po 40 µl svakog ekstrakta (u triplikatu) i dopunjeno do 120 µl metanolom. Na kraju je dodano 120 µl 0,2 %-tne metanolne otopine AlCl<sub>3</sub>. Za svaki uzorak pripremljena je i slijepa proba koja se sastojala od 40 µl ekstrakta i 200 µl metanola.

Uzorci su stajali 1 sat na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, a potom im je izmjerena apsorbancija na 405 nm.

Sadržaj flavonoida određen je pomoću baždarnog pravca kvercetin dihidrata.

Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je kao mg ekvivalenta kvercetin dihidrata po ml uzorka.

### 3.2.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina u ekstraktima provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu za određivanje derivata ružmarinske kiseline u listu ružmarina u Europskoj farmakopeji (Eur.Ph. 5,0).

Pripremljene su otopine 0.5 M klorovodične kiseline, 8.5%-tna vodena otopina natrijevog hidroksida te otopina kavene kiseline (1mg/ml) u smjesi vode i metanola.

Za izradu baždarnog pravca priređene su otopine kavene kiseline rastućih koncentracija. U jažice je otpipetirano 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 i 80  $\mu$ l otopine kavene kiseline i nadopunjeno s vodom do 100  $\mu$ l te je dodano 50  $\mu$ l 0,5 M HCl, 50  $\mu$ l nitritmolibdat reagensa i 50  $\mu$ l 8,5%-tne vodene otopine NaOH. Slijepa proba sadrži određene volumene otopine kavene kiseline nadopunjen vodom do 250  $\mu$ l.

Otpipetirano je 100  $\mu$ l svakog ekstrakta (u triplikatu) te je dodano 50  $\mu$ l 0,5 M HCl, 50  $\mu$ l nitritmolibdat reagensa i 50  $\mu$ l 8,5%-tne vodene otopine NaOH. Za svaki uzorak pripremljena je i slijepa proba koja se sastojala od odgovarajućeg volumena ekstrakta nadopunjenog destiliranom vodom za reagense do 250  $\mu$ l.

Odmah nakon pripreme uzoraka, izmjerena je apsorbancija na 492 nm. Količina ukupnih fenolnih kiselina određena je pomoću baždarnog pravca kavene kiseline. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina izražen je kao mg ekvivalenta kavene kiseline po ml uzorka.

### 3.2.6. Određivanje kelirajuće aktivnosti

Određivanje je izvršeno prema modificiranom literaturnom propisu (Decker i Welch, 1990).

Pripremljene su vodene otopine ferozina (1 mmol/L) i EDTA (0,4 mg/mL) te metanolne otopine FeSO<sub>4</sub> (0,25 mmol/L) i kvercetina (4 mg/mL).

Aktivnost keliranja  $\text{Fe}^{2+}$  određena je spektrofotometrijski tako da je u prvi niz jažica mikrotitarske pločice otpipetirano 130  $\mu\text{l}$  ekstrakta (u triplikatu) i 130  $\mu\text{l}$  metanola. U ostale jažice otpipetirano je 130  $\mu\text{l}$  metanola. Napravljena su serijska razrjeđenja, tako da je u svakoj sljedećoj jažici koncentracija uzorka dvostruko manja nego u prethodnoj (prenošenjem po 130  $\mu\text{l}$  od prvog do sedmog reda pločice). Dodano je 50  $\mu\text{l}$  metanolne otopine  $\text{FeSO}_4$  te je sve dobro promiješano. Nakon pet minuta inkubacije reakcija je pokrenuta dodatkom 50  $\mu\text{l}$  vodene otopine ferozina. U slijepu probu svakog ekstrakta dodano je 100  $\mu\text{l}$  metanola umjesto reagensa.

Nakon deset minuta stajanja na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 545 nm. Negativna kontrola sadržavala je sve osim otopine uzorka, umjesto kojeg je dodano 130  $\mu\text{l}$  metanola. Kao pozitivna kontrola korištene su otopine BHA i kvercetin, koje su serijski razrijeđene kao i ekstrakti.

Kelirajuća aktivnost (KA) izražena je u postotcima inhibicije prema:  $KA = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$ , gdje je  $A_0$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_1$  apsorbancija u prisutnosti uzorka. Rezultati su izraženi kao  $\text{EC}_{50}$ , odnosno koncentracija koja pokazuje  $KA = 50\%$ .

### 3.2.7. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Određivanje antiradikalne aktivnosti u ekstraktima provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu po Yenu i Chenu (Yen i Chen, 1995).

Pripremljene su metanolne otopine BHA (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i DPPH (0,21 mg/ml).

U prve jažice mikrotitarske pločice pipetirano je 40  $\mu\text{l}$  ekstrakta (u tripletu) i nadopunjeno sa 220  $\mu\text{l}$  metanola. U svaku sljedeću jažicu dodano je po 130  $\mu\text{l}$  metanola te su napravljena serijska razrjeđenja, tako da su u svakoj idućoj jažici koncentracije uzoraka bile dvostruko manje (prenošenjem po 130  $\mu\text{l}$  od prvog do sedmog reda pločice). U jažice je zatim dodano po 70  $\mu\text{l}$  metanolne otopine DPPH. U slijepu probu dodano je 70  $\mu\text{l}$  metanola umjesto DPPH. Kao negativna kontrola korištena je smjesa 130  $\mu\text{l}$  metanola i 70  $\mu\text{l}$  metanolne otopine DPPH. Slijepa proba negativne kontrole sadržavala je 200  $\mu\text{l}$  metanola. Kao pozitivna kontrola korištena je metanolna otopina BHA serijski razrijeđena kao i uzorci.

Nakon 30 minuta stajanja na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbanacija na 545 nm.

Moć hvatanja slobodnih radikala (*Radical scavenging activity*, RSA) izražena je kao omjer smanjenja apsorbanacije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka i apsorbanacije otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka, prema formuli:  $RSA = \frac{1-A_U}{A_D} \times 100$ , gdje je  $A_U$  apsorbanacija otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka;  $A_D$  apsorbanacija otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka (negativna kontrola).

### **3.2.8. Liofilizacija**

Uzorci su smrznuti na  $-18^{\circ}\text{C}$  i podvrgnuti liofilizaciji uz temperaturu kondenzora od  $-54^{\circ}\text{C}$  i tlak od 0.05 mbara.

### **3.2.9. Statistička obrada podataka**

Planiranje eksperimenta i statistička obrada podataka provedena je pomoću programskog paketa Design-Expert© tvrtke Stat-Ease. Sva određivanja provedena su u triplikatu, a rezultati su izraženi kao: srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Utjecaj procesnih parametara na količinu fenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost ekstrakata

Eksperimentalni podaci prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Količina polifenolnih spojeva i antioksidativna aktivnost ekstrakata vrste *Medicago Sativa L.*

<b>naziv ekstrakta</b>	<b>CD / mM</b>	<b>T / min</b>	<b>UZV %</b>	<b>TP mg/ml</b>	<b>TF mg/ml</b>	<b>TPA mg/ml</b>	<b>DPPH-EC<sup>50</sup> mg HME /ml</b>	<b>CHA-EC<sup>50</sup> mg HME /ml</b>
<b>MS-1</b>	25	15	80	2,216	0,643	0,029	198,806	207,686
<b>MS-2</b>	25	30	60	2,365	0,751	0,032	105,877	416,590
<b>MS-3</b>	15	30	80	2,304	0,566	0,031	239,507	274,285
<b>MS-4</b>	15	15	60	2,038	0,562	0,022	199,265	372,458
<b>MS-5</b>	5	30	100	2,475	0,481	0,030	250,405	539,021
<b>MS-6</b>	15	30	80	2,208	0,530	0,027	250,824	283,220
<b>MS-7</b>	25	45	80	2,287	0,573	0,030	119,482	171,167
<b>MS-8</b>	15	30	80	2,328	0,567	0,031	237,227	256,289
<b>MS-9</b>	5	30	60	1,981	0,405	0,023	106,457	135,861
<b>MS-10</b>	5	15	80	2,007	0,435	0,019	327,562	221,877
<b>MS-11</b>	5	45	80	2,264	0,481	0,027	443,421	207,116
<b>MS-12</b>	15	45	100	2,431	0,613	0,024	160,554	193,448
<b>MS-13</b>	25	30	100	2,125	0,547	0,019	64,606	138,717
<b>MS-14</b>	15	30	80	2,088	0,517	0,026	368,880	199,920
<b>MS-15</b>	15	30	80	2,128	0,515	0,028	324,557	237,271
<b>MS-16</b>	15	15	100	2,168	0,567	0,024	200,105	177,097
<b>MS-17</b>	15	45	60	2,332	0,715	0,031	206,392	150,447

TP – polifenoli, TF – flavonoidi, TPA – fenolne kiseline, DPPH – antioksidativna aktivnost, CHA – kelirajuća aktivnost

Modeli površine odgovora (eng. *response surface models*) razvijeni su kako bi se procijenio utjecaj procesnih parametara (ulaznih varijabli) na količinu fenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost (izlazne varijable) priređenih ekstrakata (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz odabranih modela i pripadajuće jednadžbe za zadane odgovore ( izlazne varijable) A – koncentracija CD (mM), B – vrijeme (min), C – UZV (%)

	Model	Jednadžba
TP	Quadratic	$TP=2,21+0,03*A-0,11*B+0,06*C+0,05*AB-0,18*AC-7,98E-003*BC-0,01A^2-5,89E-003*B^2+0,04*C^2$
TF	Quadratic	$TF=0,54+0,09*A-0,02*B+0,03*C-0,03*AB-0,07*AC-0,03*BC-0,04*A^2+0,03*B^2+0,04*C^2$
TPA	Quadratic	$TPA=0,03+1,47E-003*A+2,27E-003*B-1,22E-003*C-1,53E-003*AB-5,06 E-003*AC-2,3 E-003*BC-8,17 E-004 A^2-1,5 E-003*B^2-1,91 E-003*C^2$
DPPH	Quadratic	$DPPH=284,2-79,90*A+0,51*B+7,21*C-48,80*AB-46,30*AC-11,67*BC-35,81*A^2+23,93*B^2-116,55*C^2$
CHA	Quadratic	$CHA=250,2-21,21*A-32,12*B-3,38*C-5,44*AB-170,26*AC+55,55*BC+17,97*A^2-66,21*B^2+39,38*C^2$

Procjene parametara za opisane modele prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Procjene parametara u eksperimentalnom dizajnu: A – koncentracija CD (mM), B – vrijeme (min), C – UZV (%)

Ulazne varijable	Izlazne varijable									
	TP		TF		TPA		DPPH		CHA	
	est.	Prob >F	est.	Prob >F	est.	Prob >F	est.	Prob >F	est.	Prob >F
A	1,116	0.3259	42,254	0.0003*	2,755	0.1409	13.586	0.008*	1.43	0.271
B	12,219	0.0101*	2,560	0.1536	6,567	0.0374*	0.001	0.982	3.278	0.113
C	3,637	0.0982	4,212	0.0793	1,906	0.2098	0.111	0.749	0.036	0.854
AB	1,080	0.3332	2,217	0.1801	1,485	0.2624	2.535	0.155	0.047	0.835
AC	16,858	0.0045*	12,991	0.0087*	16,330	0.0049*	2.282	0.175	46.063	0*
BC	0,032	0.8634	1,897	0.2108	3,366	0.1092	0.145	0.715	5.643	0.049*
A <sup>2</sup>	0,073	0.7946	3,865	0.0900	0,448	0.5250	1.437	0.27	0.54	0.486
B <sup>2</sup>	0,018	0.8962	2,726	0.1427	1,510	0.2588	0.642	0.449	7.333	0.03*
C <sup>2</sup>	0,717	0.4250	5,448	0.0523	2,455	0.1612	15.221	0.006*	2.593	0.151

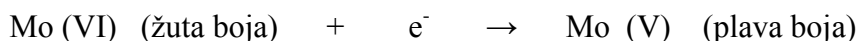
\*p<0.05

Iz tablice 5 može se vidjeti kako interakcija dvaju parametara, koncentracije CD i snage ultrazvuka (AC), signifikantno utječe na količinu polifenola u pripremljenim ekstraktima. Budući da CD djeluju kao solubilizatori, taj učinak je očekivan. Uz to, vrijeme ekstrakcije (B) također značajno utječe na koncentraciju polifenola u ispitivanim ekstraktima. Na količinu flavonoida, koji su slabo topljivi u vodi, značajno utječe koncentracija CD promatrana kao zaseban parametar, ali i u kombinaciji sa snagom ultrazvuka. Kod procjene udjela fenolnih kiselina značajnu ulogu ima vrijeme ekstrakcije te interakcija koncentracije

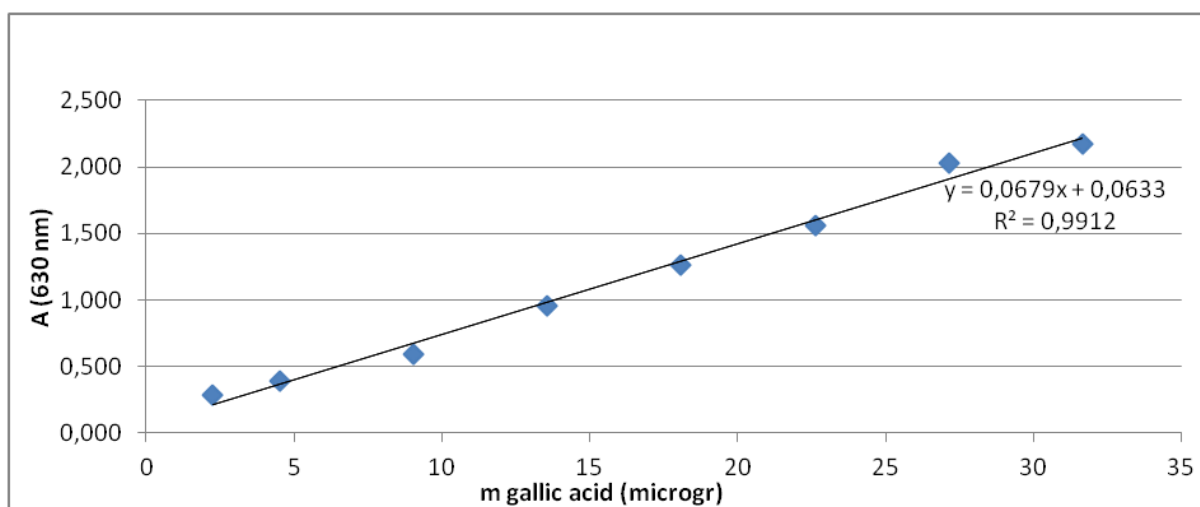
CD i snage ultrazvuka. U ispitivanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata DPPH metodom, signifikantna je koncentracija CD ako pretpostavimo da ukupnom antioksidativnom učinku više pridonose teško topive komponente ekstrakta za koje je potrebna veća količina CD da se otope. Interakcije koncentracije CD i vremena ekstrakcije sa snagom ultrazvuka (AC i BC) imaju signifikantan značaj na ukupnu kelirajuću aktivnost ekstrakta, što znači da je potrebno dobro optimirani uvjete ekstrakcije kako bi kelirajući potencijal u potpunosti bio izražen.

## 4.2. Određivanje količine polifenola

Ukupni polifenoli u ekstraktima određeni su pomoću Folin-Ciocalteu reagensa koji s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene spojeve čiji se intenzitet obojenja može mjeriti spektrofotometrijski. Kemijska struktura Folin-Ciocalteu reagensa nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da se sastoji od fosfomolibdenskih i fosfovolframskih heteropoli kiselina koje su žute boje. U prisustvu fenola u bazičnom reakcijskom mediju nastaje Mo-W kompleks koji reakcijsku smjesu oboji u plavo. Smatra se da fenoli reduciraju ion molibdena koji u drugom valentnom stanju ima drugačiju boju, pa je mehanizam reakcije:

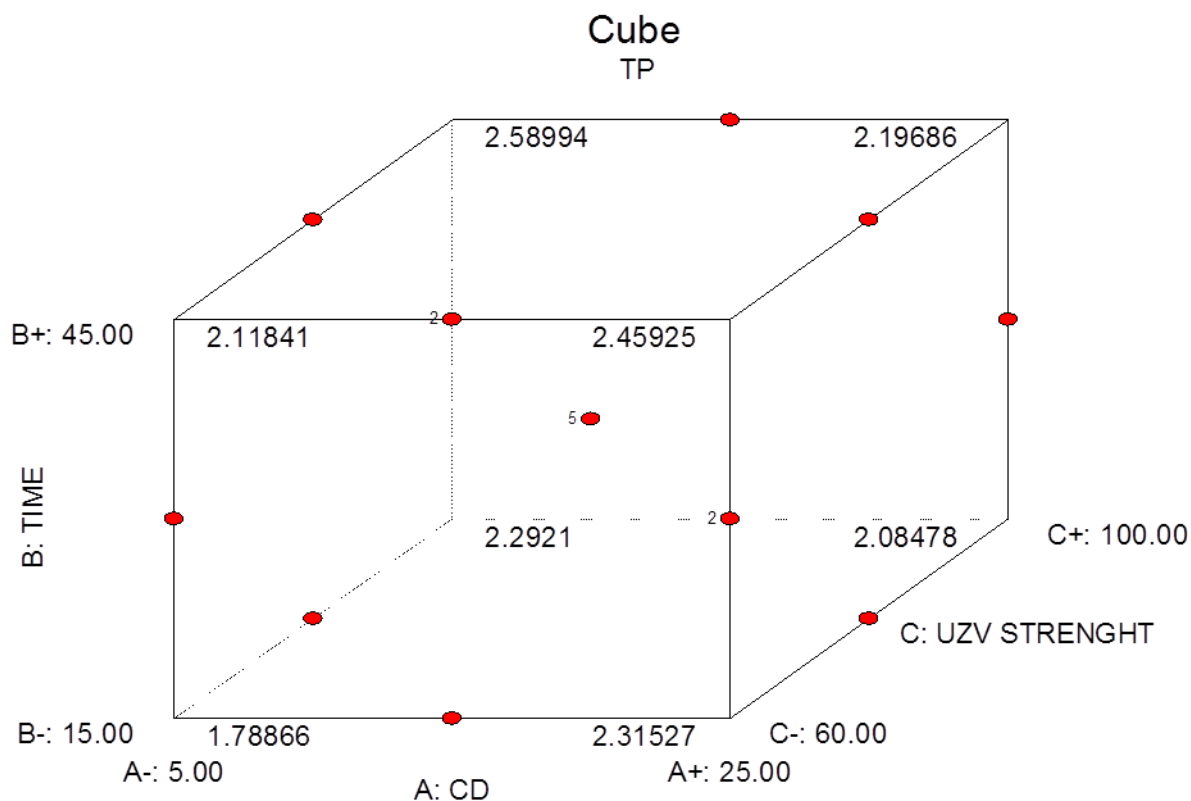


Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći baždarni pravac galne kiseline (graf 1) ( $R^2 > 0.991$ ).



Graf 1. Baždarni pravac galne kiseline





Slika 14. Količina polifenola (TP mg/ml) u ekstraktima, ovisno o zadanim uvjetima

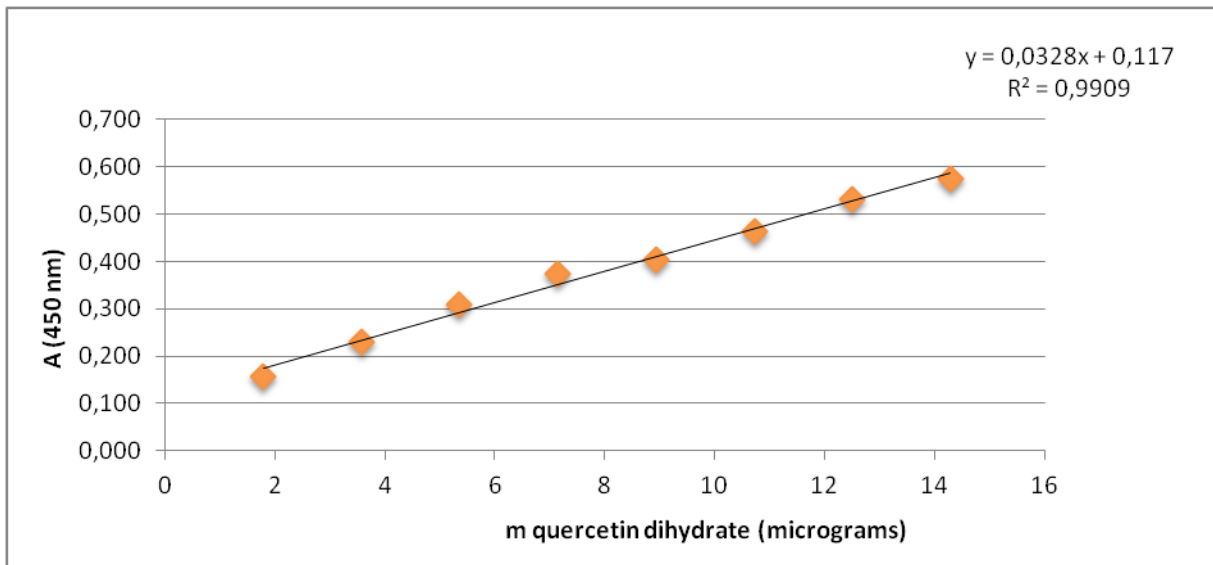
Iz priložene slike vidi se da produljivanjem vremena ultrazvučne ekstrakcije pri koncentraciji CD od 5 mM i snazi ultrazvuka od 60 % raste količina polifenola u ekstraktu. Međutim ako povećamo koncentraciju CD na 25 mM, promjena vremena više ne utječe značajno na ekstrakciju polifenola.

Kod koncentracije CD od 5 mM raste količina polifenola ukoliko povećamo snagu ultrazvuka. Povećanjem koncentracije CD na 25 mM i povećanjem snage ultrazvuka smanjuje se količina polifenola u ekstraktu, neovisno o vremenu ekstrakcije.

Najveći udio polifenola (2,59 mg/ml) ekstrahira se pri uvjetima: koncentracije ciklodekstrina od 5 mM, vremenu od 45 minuta i snazi ultrazvuka od 100 %; dok se najmanji udio polifenola (1,78 mg/ml) ekstrahira pri uvjetima: koncentracije ciklodekstrina od 5 mM, vremenu od 15 minuta i snazi ultrazvuka od 60 %.

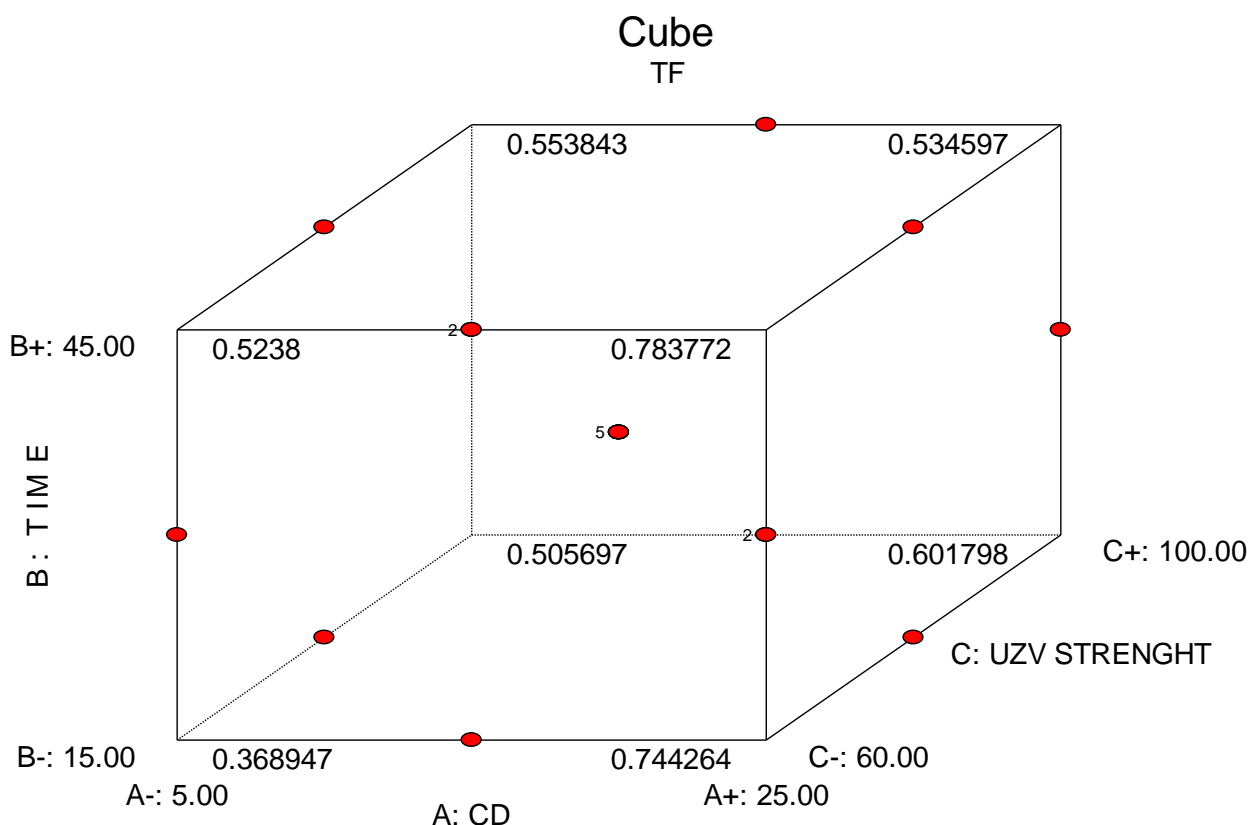
### 4.3. Određivanje količine flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida temelji se na reakciji flavona i flavonola s aluminijskim ionima iz reakcijske smjese pri čemu se formiraju kelati, a reakcijska smjesa oboji se žuto. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći baždarni pravac kvercetin dihidrata (graf 2) ( $R^2 > 0,99$ ).



Graf 2. Baždarni pravac kvercetin dihidrata

Količina ekstrahiranih flavonoida prikazana je na slici 15.

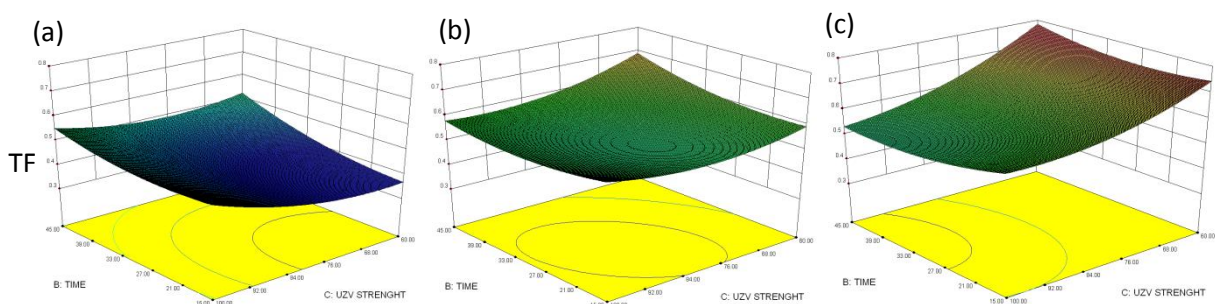


Slika 15. Količina flavonoida (TF mg/ml) u ekstraktima, ovisno o zadanim uvjetima

Priložena slika prikazuje kako je promjena vremena ekstrakcije značajna jedino kod koncentracije CD od 5 mM i snage ultrazvuka od 60%, pri čemu se produljivanjem vremena ekstrakcije povećava količina flavonoida u ekstraktu. Produljivanjem vremena ekstrakcije pri ostalim uvjetima ne dolazi do značajnih promjena u količini ekstrahiranih flavonoida. Povećanjem koncentracije CD raste i količina flavonoida samo pri snazi ultrazvuka od 60% neovisno o vremenu ekstrakcije.

Najveći udio flavonoida (0,78 mg/mL) ekstrahira se pri uvjetima: koncentracije ciklodekstrina od 25 mM, vremenu od 45 minuta i snazi ultrazvuka od 60 %; dok se najmanji udio flavonoida (0,37 mg/ml) ekstrahira pri uvjetima: koncentracije ciklodekstrina od 5 mM, vremenu od 15 minuta i snazi ultrazvuka od 60 %.

Iz navedenih podataka može se vidjeti kako veća koncentracija CD rezultira višim udjelom flavonoida u ekstraktima, što je i za očekivati s obzirom na velik solubilizacijski potencijal CD (slika 16).

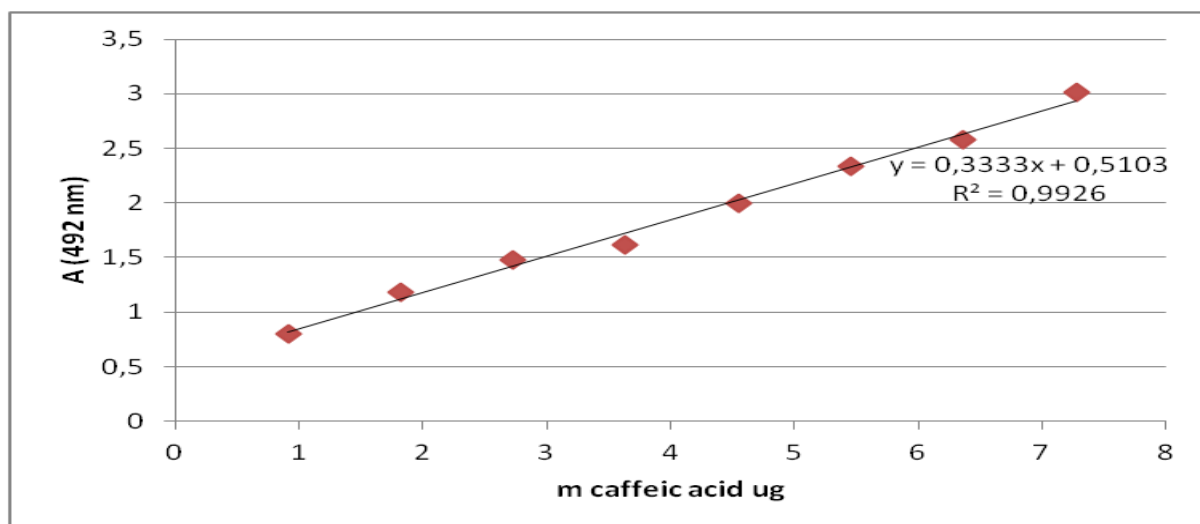


Slika 16. Utjecaj koncentracije ciklodekstrina na solubilizaciju flavonoida (TF). (a) 5 mM CD, (b) 15 mM CD, (c) 25 mM CD

#### 4.4. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

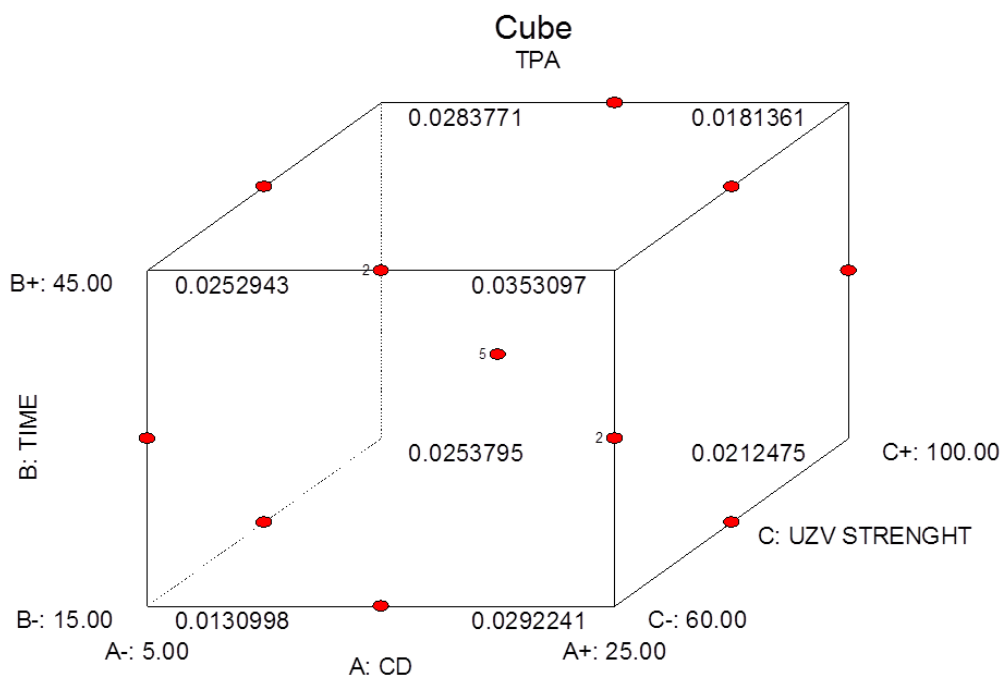
Određivanje fenolnih kiselina temelji se na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidoksicimetnih derivata koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine žuta boja prelazi u narančastocrvenu (Vladimir-Knežević i Blažeković. 2008).

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka. koristeći baždarni pravac kavene kiseline (graf 3) ( $R^2 > 0.993$ ).



Graf 3. Baždarni pravac kavene kiseline

Rezultati su prikazani na slici 17.

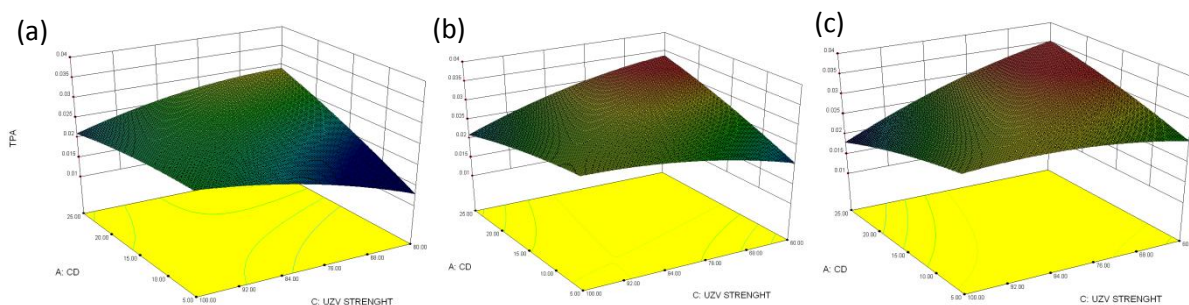


Slika 17. Količina fenolnih kiselina (TPA mg/ml) u ekstraktima, ovisno o zadanim uvjetima

Iz slike je vidljivo da količina ekstrahiranih fenolnih kiselina raste s povećanjem koncentracije CD i vremena ultrazvučne ekstrakcije uz konstantnu snagu ultrazvuka od 60 %. Pri većim koncentracijama CD smanjuje se količina fenolnih kiselina kako se povećava snaga ultrazvuka.

Najveći udio fenolnih kiselina (0,035 mg/mL) ekstrahira se pri uvjetima: koncentracije ciklodekstrina od 25 mM, vremenu od 45 minuta i snazi ultrazvuka od 60 %; dok se najmanji udio flavonoida (0,013 mg/ml) ekstrahira pri uvjetima: koncentracije ciklodekstrina od 5 mM, vremenu od 15 minuta i snazi ultrazvuka od 60 %.

Iz navedenog se može vidjeti kako uz koncentraciju CD, najveći utjecaj na količinu ekstrahiranih fenolnih kiselina ima duljina trajanja ekstrakcije ( Slika 18).

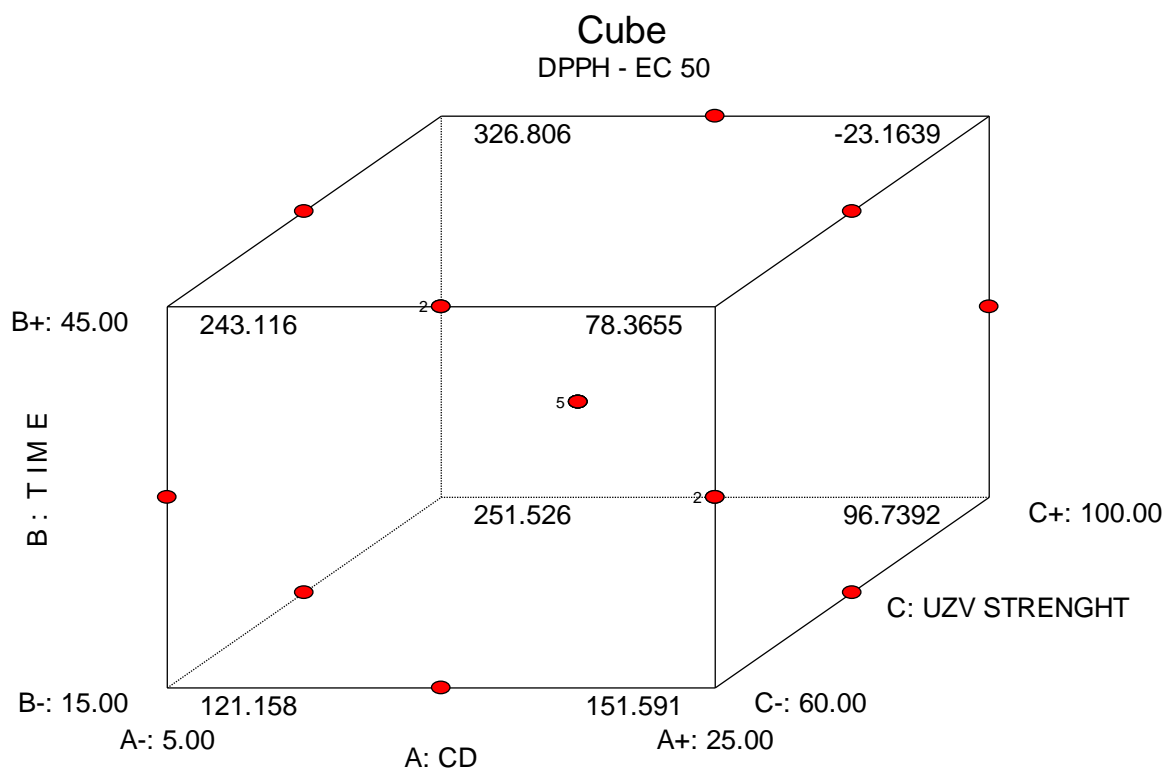


Slika 18. Utjecaj duljine trajanja ekstrakcije na količinu fenolnih kiselina (TPA). (a) 15 min, (b) 30 min, (c) 45 min

## 4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

### 4.5.1. Antiradikalna aktivnost

U određivanju antiradikalne aktivnosti korišten je slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) koji je vrlo pogodan za *in vitro* ispitivanja antiradikalne aktivnosti. Metoda se temelji na redukciji stabilnog DPPH radikala u prisustvu antioksidansa. Za razliku od hidroksilnog radikala i superoksid aniona na njega ne utječu sporedne reakcije poput kelacije metalnih iona i enzimske inhibicije. Antioksidansi koji ulaze u reakciju s DPPH doniraju mu vodik ili elektron i pri tome ga prevode u bezbojni produkt 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin. Pri tome nestaje intenzivna ljubičasta boja što dovodi do pada apsorbancije. Veći pad apsorbancije odgovara većoj antiradikalnoj aktivnosti (Amarowicz i sur., 2004). Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta biljnog materijala (*eng. herbal material equivalents*, HME) po ml uzorka (Slika 19).



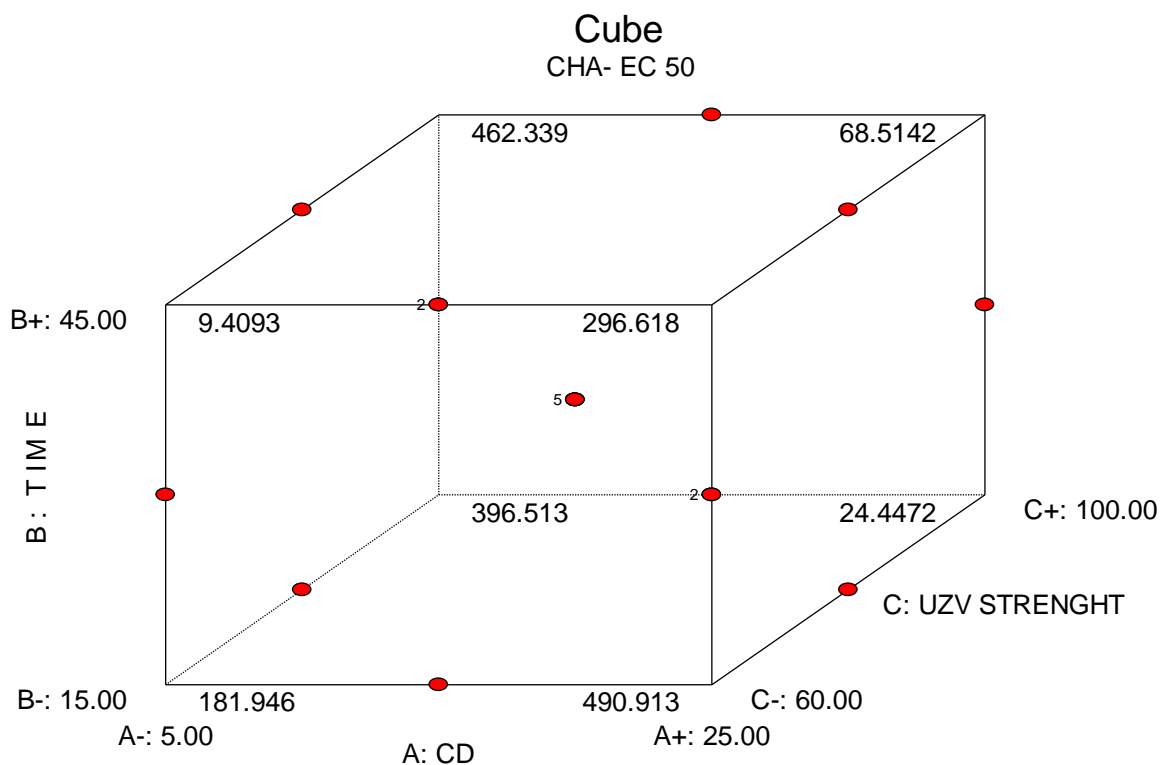
Slika 19. Vrijednosti EC 50 **mg HME/ml** kod određivanja antiradikalne aktivnosti ekstrakata

Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti ekstrakata na slici prikazani su kao EC50 vrijednost. Što je EC50 vrijednost manja antiradikalna aktivnost priređenih ekstrakata je veća. Produljenjem vremena ekstrakcije ilii povećavanjem snage ultrazvuka pri koncentraciji CD od 5 mM smanjuje se antiradikalna aktivnost, dok se pri koncentraciji CD od 25 mM povećava antiradikalna aktivnost ekstrakta. Dakle, povećavanjem koncentracije CD-a u sustavu raste antiradikalna aktivnost priređenih ekstrakata. Budući da se povećavanjem koncentracije CD ekstrahira više flavonoida i ostalih polifenola, takav rezultat je očekivan.

Najveća antiradikalna aktivnost dobivena je pri uvjetima: koncentracije CD od 25 mM, vremenu 45 min i snazi ultrazvuka od 100%.

#### **4.5.2. Kelirajuća aktivnost**

Ispitivanje kelirajuće aktivnosti ekstrakata temelji se na keliranju iona  $Fe^{2+}$  iz kompleksa s ferozinom u otopini u kompleks s biljnim kelatorom koji ne apsorbira na 545 nm. Sposobnost kelacije izražava se u postocima smanjenja apsorbancije u odnosu na negativnu kontrolu koja sadrži sve osim ekstrakta i stoga ima maksimalnu apsorbanciju na 545 nm jer sav  $Fe^{2+}$  ulazi u kompleks s ferozinom. Kao pozitivna kontrola korištena je EDTA koja je jak kelator  $Fe^{2+}$ . Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata biljnog materijala (*eng. herbal material equivalents. HME*) po ml uzorka (Slika 20).



Slika 20. Vrijednosti EC 50 **mg HME/ml** kod određivanja kelirajuće aktivnosti ekstrakata

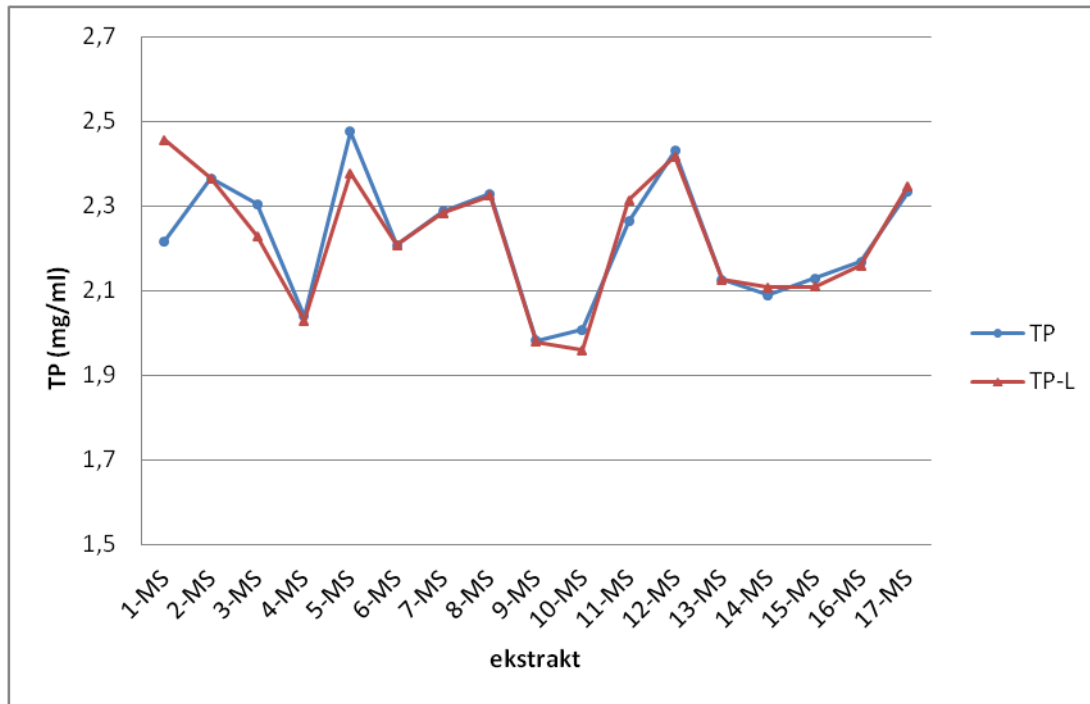
Rezultati određivanja kelirajuće aktivnosti na slici prikazani su kao EC50 vrijednost, odnosno koncentracija koja izaziva uklanjanje 50 % Fe<sup>2+</sup> iona iz kompleksa s ferozinom te uzrokuje smanjenje apsorbancije otopine za polovinu. Dakle, što je EC50 manja, ekstrakt je bolji kelator Fe<sup>2+</sup> iona. Iz priložene slike 20. vidljivo je da pri većoj koncentraciji CD-a u sustavu, produživanje vremena ultrazvučne ekstrakcije kao i povećavanje snage ultrazvučne ekstrakcije rezultira porastom kelirajuće aktivnosti priređenih ekstrakata.

Ciklodekstrini inkapsuliraju biljne sastavnice te na taj način povećavaju kelirajuću aktivnost, dok produživanjem vremena te povećanjem snage ultrazvučne ekstrakcije povećavamo količinu biljnog kelatora.



#### 4.6. Utjecaj procesa liofilizacije na količinu fenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost ekstrakata

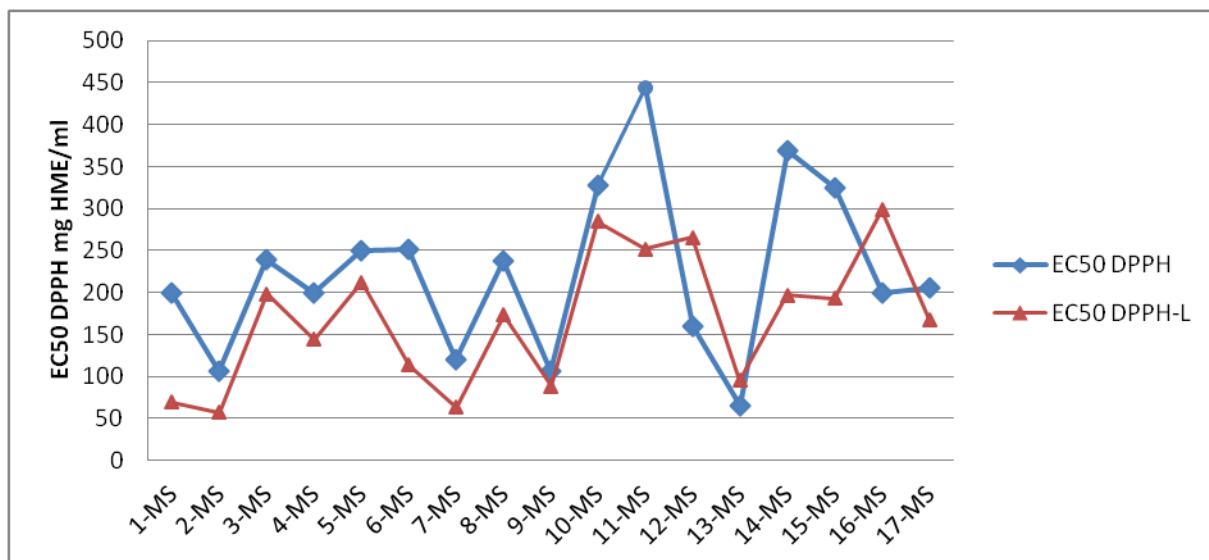
Količina ukupnih polifenola prije i nakon liofilizacije prikazana je na grafu 4.



Graf 4. Količina ukupnih polifenola. Ekstrakti su numerirani kao što je navedeno u tablici 2. Slovo L označava liofilizirane ekstrakte.

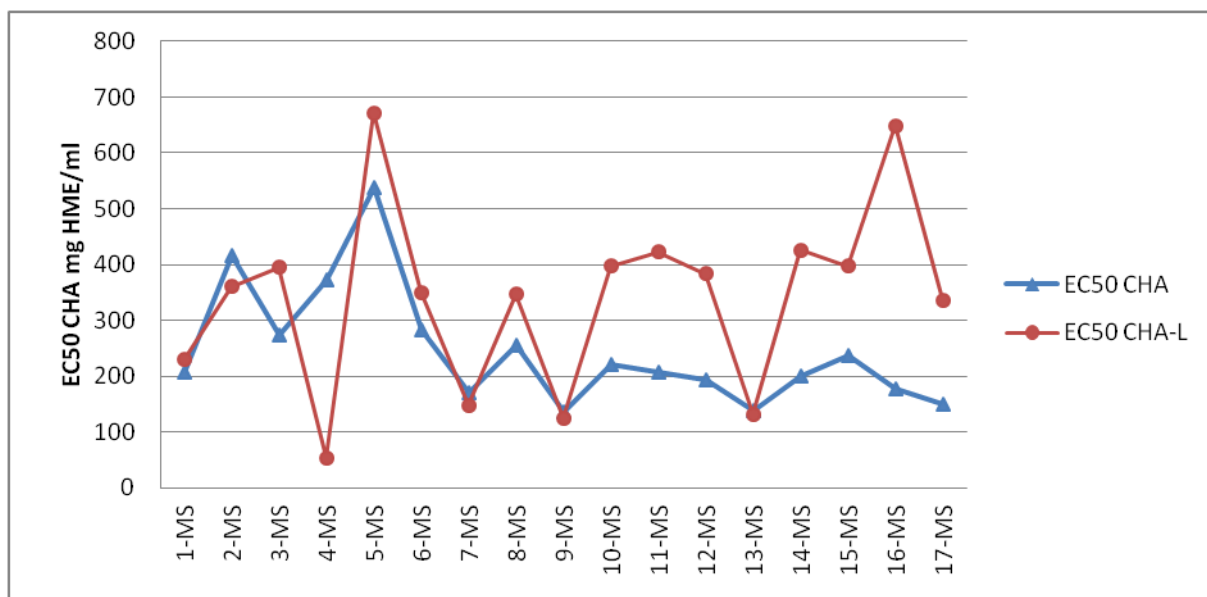
Iz navedenog grafa može se vidjeti kako je količina ukupnih polifenola u pripremljenim ekstraktima nakon procesa liofilizacije ostala očuvana. Poznato je kako standardne komercijalne metode koje se koriste za sušenje biljnog materijala mogu degradirati važne biološki aktivne komponente te promijeniti osjetljivu biokemijsku ravnotežu ekstrakata, što se primjenom procesa liofilizacije može izbjeći.

Antioksidativni učinak liofiliziranih ekstrakata procijenjen je određivanjem antiradikalne i kelirajuće aktivnosti (graf 5 i graf 6).



Graf 5. Antiradikalna aktivnost ekstrakata. Ekstrakti su numerirani kao što je navedeno u tablici 2. Slovo L označava liofilizirane ekstrakte.

Antiradikalna aktivnost ekstrakata prikazana je kao EC50 vrijednost. Što je EC50 vrijednost manja to je antiradikalna aktivnost priređenih ekstrakata veća. Prema tome, iz grafa 5 može se zaključiti da liofilizirani ekstrakti uglavnom imaju nešto veću antiradikalnu aktivnost od neliofiliziranih ekstrakata.



Graf 6. Kelirajuća aktivnost ekstrakata. Ekstrakti su numerirani kao što je navedeno u tablici 2. Slovo L označava liofilizirane ekstrakte.

Iz grafa 6 vidi se da je kelirajuća aktivnost neliofiliziranih ekstrakata veća od liofiliziranih ekstrakata.

Budući da nakon procesa liofilizacije ekstrakata antiradikalna aktivnost raste, a kelirajuća blago pada, možemo zaključiti kako je ukupan antioksidativni potencijal ekstrakata ostao očuvan.

#### 4.7. Optimizacija uvjeta ekstrakcije

Ekstrakcijski uvjeti u kojima je moguće ekstrahirati maksimalnu količinu polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina te postići najbolju antioksidativnu aktivnost prikazani su u tablici 6.

	<b>MS-F</b>	<b>MS-OX</b>	<b>MS-FOX</b>
<b>CD(mM)</b>	25	13,86	20,54
<b>T(min)</b>	18,40	45	45
<b>UZV(%)</b>	60	60	60

Tablica 6. Najpovoljniji ekstrakcijski uvjeti za pripremu ekstrakta sa maksimalnom količinom fenolnih spojeva (MS-F), ekstrakta s najboljom antioksidativnom aktivnosti (MS-OX) , te ekstrakta koji ima maksimalnu količinu fenolnih spojeva i najbolju antioksidativnu aktivnost (MS-FOX)

## 5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenih eksperimenata te obrade dobivenih rezultata doneseni su slijedeći zaključci:

1. Primjenom ciklodekstrina moguće je uspješno izolirati značajne količine fenolnih spojeva iz biljne vrste *Medicago sativa*, L. pri čemu priređeni ekstrakti pokazuju značajan antioksidativni učinak u *in vitro* uvjetima.
2. Primjenom QbD pristupa moguće je uspješno optimirati postupak ekstrakcije te prirediti uzorke s maksimalnom količinom fenolnih spojeva, uzorke s maksimalnom antioksidativnom aktivnosti te uzorke s istovremeno optimiranim sadržajem fenolnih spojeva i antioksidativnom aktivnosti.
3. Postupkom liofilizacije moguće je očuvati količinu važnih biološki aktivnih komponenti iz biljke.

## 6. LITERATURA

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi I, Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity prairies. *Food Chem*, 2004, 84, 551-562.

Bora KS, Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharm Biol*, 2011, 49, 211-220.

Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliver Rev*, 2007, 59, 645-666.

Caunii A, Pribac G, Grozea I, Gaitin D, Samfira I. Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chem Cent J*, 2012, 6, 123.

Decker EA, Welch B. Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*, 1990, 38, 674-677.

*European Pharmacopoeia. Fifth Edition (Eur. Ph. 5,0), Vol.1, Vol.2, Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2005, 222, 2377-2378.*

Frömning KH, Szejtli J. *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical Applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and saefty evaluation. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 147-162.

Jug M, Bećirević-Laćan M. Ciklodekstrini-nosači lijekova. *Farm glas*, 2002, 6, 189-204.

Karimi E, Oskoueian E, Oskoueian A, Omidvar V, Hendra R, Nazeran H. Insight into the functional and medicinal properties of *Medicago sativa* (Alfalfa) leaves extract. *J Med Plants Res*, 2013, 7, 290-297.

Khaleel AE, Gad MZ, El-Maraghy SA, Hifnawy MS, Abdel-Sattar E. Study of Hypocholesterolemic and Antiatherosclerotic Properties of *Medicago sativa* L. Cultivated in Egypt. *J Food Drug Anal*, 2005, 13, 212-218.

Kumazawa S, Hasamaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*, 2004, 84, 329-339.

Lavakumar V. *et al.* Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *Inter J Novel Trends in Pharm Sci*, 2013, 3, 87-98.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilisation, *J Pharm Sci*, 1996, 85, 1017-1025.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418-425.

Plants for a future, 2012, <http://www.pfaf.org> , pristupljeno 05.03.2015.

Rathore AS, Winkle H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*, 2009, 27, 26-34.

Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem.*, 2003, 51, 2866-2887.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 299, 152-178.

Sharma P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot*, 2012, 2012, 1-26.

Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, 1998, 98, 1743-1753.

Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agr Food Chem*, 1995, 43, 27-32.



## 7. SAŽETAK

Biljka lucerna (*Medicago sativa L.*) nalazi široku primjenu u ljekovite svrhe. Posjeduje antimikrobno, protuupalno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje zbog prisutnosti fenolnih komponenti koje se ponašaju kao slobodni radikali i kelatori metala. Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka najčešće su korištena organska otapala koja negativno utječu na okoliš i ljude. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio optimizirati uvjete ekstrakcije fenolnih komponenti iz vrste *Medicago sativa L.* korištenjem vodene otopine hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina. Korištenjem programa za statističko planiranje eksperimenta uspoređen je utjecaj različitih procesnih parametara na učinkovitost ekstrakcije. Određeni su najpovoljniji ekstrakcijski uvjeti u kojima je moguće ekstrahirati maksimalnu količinu polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina te postići najbolju antioksidativnu aktivnost. Ispitan je i utjecaj liofilizacije na antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Postupkom liofilizacije očuvana je količina fenolnih komponenti. Nakon procesa liofilizacije ekstrakata antiradikalna aktivnost raste, a kelirajuća blago pada, što znači da ukupan antioksidativni potencijal ekstrakata ostaje očuvan.

## 8. SUMMARY

The Alfalfa (*Medicago sativa L.*) is widely used in medicinal purposes. The plant has been reported to have antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer and antioxidant effects. These biological activities could be attributed to the presence of both phenolic compounds which act as free radical scavengers and metal chelators. Organic solvents are usually used for the extraction of phenolic compounds from plants which affect adversely on the environment and people. Therefore, the purpose of this diploma thesis was to optimize the extraction conditions of phenol components from *Lotus corniculatus L.* using aqueous solution of HP $\beta$ CD. By using the programmes for the statistical design of the experiments it is compared the effect of different process parameters on the extraction efficiency. Some are more favorable extraction conditions in which it is possible to extract the maximum amount of polyphenols, flavonoids and phenolic acids and achieve the best antioxidant activity. The effect of lyophilization is also examined on the antioxidant activity of the extracts. The amount of phenolic components is preserved by freeze drying process. After lyophilization process extracts antiradical activity is growing, and chelating gently fall, which means that the total antioxidant potential of extracts remains preserved.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### IZOLACIJA ANTIOKSIDATIVNIH SASTAVNICA BILJKE *MEDICAGO SATIVA L.* PRIMJENOM CIKLODEKSTRINA

Sara Šimić

#### SAŽETAK

Biljka lucerna (*Medicago sativa L.*) nalazi široku primjenu u ljekovite svrhe. Posjeduje antimikrobno, protuupalno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje zbog prisutnosti fenolnih komponenti koje se ponašaju kao slobodni radikali i kelatori metala. Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka najčešće su korištena organska otapala koja negativno utječu na okoliš i ljude. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio optimizirati uvjete ekstrakcije fenolnih komponenti iz vrste *Medicago sativa L.* korištenjem vodene otopine hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina. Korištenjem programa za statističko planiranje eksperimenta uspoređen je utjecaj različitih procesnih parametara na učinkovitost ekstrakcije. Određeni su najpovoljniji ekstrakcijski uvjeti u kojima je moguće ekstrahirati maksimalnu količinu polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina te postići najbolju antioksidativnu aktivnost. Ispitan je i utjecaj liofilizacije na antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Postupkom liofilizacije očuvana je količina fenolnih komponenti. Nakon procesa liofilizacije ekstrakata antiradikalna aktivnost raste, a kelirajuća blago pada, što znači da ukupan antioksidativni potencijal ekstrakata ostaje očuvan.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 26 grafičkih prikaza, 6 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Medicago sativa L.*, eksperimentalni dizajn, ciklodekstrini, polifenoli, antioksidativna aktivnost, liofilizacija

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Jug**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Jasna Jablan**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Željka Vanić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Srpanj 2015.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ISOLATION OF ANTIOXIDANT COMPONENTS OF *MEDICAGO SATIVA L.* USING CYCLODEXTRINS

Sara Šimić

#### SUMMARY

The Alfalfa (*Medicago sativa L.*) is widely used in medicinal purposes. The plant has been reported to have antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer and antioxidant effects. These biological activities could be attributed to the presence of both phenolic compounds which act as free radical scavengers and metal chelators. Organic solvents are usually used for the extraction of phenolic compounds from plants which affect adversely on the environment and people. Therefore, the purpose of this diploma thesis was to optimize the extraction conditions of phenol components from *Lotus corniculatus L.* using aqueous solution of HP $\beta$ CD. By using the programmes for the statistical design of the experiments it is compared the effect of different process parameters on the extraction efficiency. Some are more favorable extraction conditions in which it is possible to extract the maximum amount of polyphenols, flavonoids and phenolic acids and achieve the best antioxidant activity. The effect of lyophilization is also examined on the antioxidant activity of the extracts. The amount of phenolic components is preserved by freeze drying process. After lyophilization process extracts antiradical activity is growing, and chelating gently fall, which means that the total antioxidant potential of extracts remains preserved.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 26 figures, 6 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Medicago sativa L.*, experimental design, cyclodextrins, polyphenols, antioxidative activity, lyophilization

Mentor: **Mario Jug, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Jug, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Željka Vanić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.