

Ultrazvučna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz vrste *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don upotrebom (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina

Tomić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:900650>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

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



Dora Tomić

Ultrazvučna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz
vrste *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don
upotrebom (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija i izrađen na Zavodu za farmakognozijsku vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

Veliko hvala upućujem prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na strpljenju te stručnom mentorstvu. Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za farmakognozijsku na susretljivosti i pomoći te dr. sc. Marijanu Marijanu na savjetima i suradnji tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada. Posebnu zahvalu upućujem obitelji, dečku i prijateljima, na razumijevanju, ljubavi i potpori.

Naposljetku, najveće hvala dragom Bogu na ovome danu i na svemu u Njegovom dobrom planu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Smilje (<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don)	1
1.2 Polifenoli	2
1.2.1 Fenolne kiseline.....	3
1.2.1.1 Klorogenska kiselina	4
1.2.2 Flavonoidi.....	5
1.3 Ultrazvučna ekstrakcija	6
1.4 Ciklodekstrini	7
1.4.1 (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin.....	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1 Materijali	10
3.1.1 Biljni materijal.....	10
3.1.2 Kemikalije	10
3.1.3 Uređaji.....	10
3.2 Metode.....	11
3.2.1 Ultrazvučna ekstrakcija	11
3.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola.....	12
3.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida.....	13
3.2.4 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih kiselina	14
3.2.5 Kvantifikacija klorogenske kiseline korištenjem HPLC-a.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1 Određivanje ukupnih polifenola	16
4.2 Određivanje ukupnih flavonoida	18
4.3 Određivanje ukupnih fenolnih kiselina	20
5. ZAKLJUČAK	24

6. LITERATURA.....	25
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	31
7.1 Sažetak	31
7.2 Summary	31
8. PRILOZI.....	33
Temeljna dokumentacijska kartica.....	34
Basic documentation card	35

1. UVOD

1.1 Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Smilje (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don) je višegodišnji zimzeleni polugrm iz porodice glavočika (Asteraceae, Slika 1). Tipična je mediteranska biljka koja se zbog svoje morfologije uspješno prilagođava krškom tlu, sušnim razdobljima i visokim temperaturama (Ninčević i sur., 2019). Mlade stabljike i listovi prekriveni su sitnim gustim dlačicama i debelom kutikulom koja ograničava gubitak vode. Listovi su uski i šiljasti, s lica zeleni, manje dlakavi i rijetko raspoređenih žlijezda, a s naličja sivo-zeleni, gusto prekriveni dlačicama i žlijezdama (Bilandžija i sur., 2022). Navedene karakteristike omogućuju rast u širokom rasponu nadmorskih visina, između razine mora i 2200 m, na visokim temperaturama, ali i oštroj zimi (Nostro i sur., 2001). Latinski naziv roda potječe od grčkih riječi helis – sunce i chrisos – zlatan ukazujući na karakterističnu zlatnožutu boju cvjetova. Boja ostaje intenzivna nakon cvatnje i sušenja zbog čega je smilje dobilo svoj poznati naziv *immortelle* što na francuskom znači besmrtnan (Rajić i sur., 2015). Zbog svojih ljekovitih svojstava koristi se već dugo vremena, a i danas ima važnu ulogu u tradicionalnoj medicini mediteranskih zemalja.



Slika 1. Smilje (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don, Asteraceae).

(Izvor: <https://gospodarski.hr/>).

Najčešće korišteni biljni dijelovi su cvjetovi, listovi i stabljika jer su bogatiji bioaktivnim sastavnicama od podzemnih dijelova. Primjenjuju se u liječenju zdravstvenih tegoba poput infekcija, rana, alergija, prehlada i kašlja (Viegas i sur., 2014). Primjena eteričnog ulja vrlo je raširena u kozmetici, posebno u proizvodima za njegu starije kože. Ima dokazano djelovanje na smanjenje lipidne peroksidacije uzrokovane UV zračenjem i na redukciju bora. Na smanjenje lipidne peroksidacije pokazuje bolje učinke i od vitamina E primijenjenog u koncentraciji 1 %. Ipak, najbolji rezultati vidljivi su u sinergiji ulja i vitamina E (Combes i sur., 2017). *In vitro* su potvrđeni inhibitorski učinci na enzime elastazu i kolagenazu odgovorne za razgradnju elastina i kolagena te se tu nalazi potencijal za daljnja istraživanja (Fraternale i sur., 2019).

Različitim metodama ekstrakcije, izoliran je velik broj kemijskih spojeva koji u sinergiji, ali i pojedinačno doprinose farmakološkim učincima. Neki od novodokazanih učinaka su: snižavanje koncentracije LDL-a, povećanje antioksidativnog potencijala seruma (Kenig i sur., 2022) te antimikrobna aktivnost na širok spektar Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija (Primitivo i sur., 2022).

Od svih biološki aktivnih tvari, u ekstraktima su, uz komponente eteričnog ulja, najzastupljenije fenolne sastavnice: acetofenoni, fluoroglucinoli, kumarini, kumarati, fenolne kiseline i flavonoidi (Maksimović i sur., 2017).

1.2 Polifenoli

Polifenoli su heterogena skupina spojeva koja se veličinom razlikuje od jednostavnih molekula do kompleksnih polimera. Njihova osnovna strukturna karakteristika je prisutnost benzenskog prstena s najmanje jednom hidroksilnom skupinom čiji broj i položaj značajno utječe na bioaktivnost. Osnovna podjela polifenola je na flavonoide i neflavonoide. S obzirom na broj benzenskih prstenova i strukturne elemente koji ih povezuju, možemo ih detaljnije podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (El Gharras, 2009).

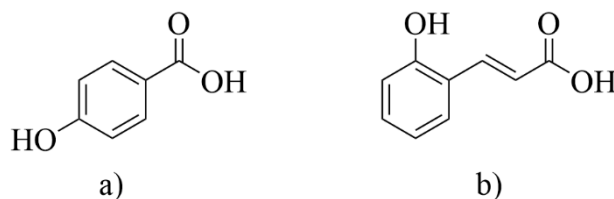
Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti što znači da nisu esencijalni za rast i razvoj biljke, ali sudjeluju u njejoj interakciji s okolišem. Primarno služe u borbi protiv patogena i zaštiti od UV-zračenja, ali i brojnim drugim funkcijama korisnim za preživljavanje. Također, imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima ljudskog organizma i veliki potencijal u prevenciji i terapiji različitih bolesti, posebno onih vezanih uz oksidativni stres. Svoje učinke u organizmu

ostvaruju različitim mehanizmima; uklanjanjem slobodnih radikala, keliranjem metala, eliminacijom prekursora radikala te brojnim drugim (Chaudari i Badole, 2014). Ovisno o vrsti polifenola, antioksidativni potencijal varira jer ponajviše ovisi o strukturi molekule (Balasundram i sur., 2006).

U prehrani su vrlo zastupljeni, a epidemiološke studije upućuju da njihov povećan unos može smanjiti rizik od degenerativnih bolesti kao što su karcinomi i kardiovaskularne bolesti (Shivashankara i sur., 2010).

1.2.1 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su ne flavonoidni fenolni spojevi od velikog značaja za ljudsku prehranu. U biljkama su zastupljeni u dva osnovna strukturna oblika, kao derivati hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline (Slika 2), čiji je sadržaj u jestivom bilju, u pravilu vrlo nizak (Pandey i sur., 2009).



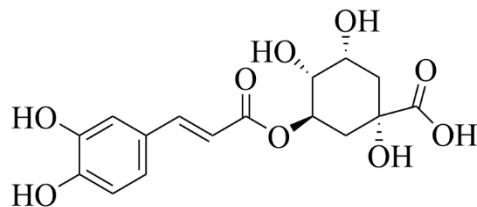
Slika 2. Kemijske strukture hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline.

Hidroksicimetne kiseline su u većim količinama zastupljene u hrani te posjeduju veću antioksidativnu aktivnost od derivata hidroksibenzojeve kiseline. Pretpostavka je da CH=CH-COOH skupina, lakše donira vodikov elektron i omogućuje bolju radikalnu stabilizaciju od COOH skupine hidroksibenzojeve kiseline (Balasundram i sur., 2006). Mnogi polifenoli, posebice fenolne kiseline, izravno sudjeluju u odgovoru biljaka na različite vrste stresa: pridonose zacjeljivanju lignifikacijom oštećenih područja, posjeduju antimikrobna svojstva, a njihove se koncentracije mogu povećati nakon infekcije (Pandey i sur., 2009). Rijetko se nalaze u slobodnom obliku, većinom su glikozilirane ili u obliku estera, na primjer klorogenska i ružmarinska kiselina. Kavena kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina te predstavlja većinu ukupne koncentracije hidroksicimetne kiseline u raznim vrstama voća. Voće koje fenolne

kiseline sadrži u najvećim koncentracijama su borovnice, šljive, trešnje i jabuke (Manach i sur., 2004).

1.2.1.1 Klorogenska kiselina

Klorogenska kiselina je polifenol iz skupine fenolnih kiselina, derivata hidroksicimetne kiseline (Slika 3). Ester je kavene i kinonske kiseline. Zastupljena je u voću, kao i ostale fenolne kiseline, u borovnicama, jabukama, trešnjama i šljivama no ipak u najvećim koncentracijama prisutna je u kavi. Samo jedna šalica kave može sadržavati i do 350 mg klorogenske kiseline (Manach i sur., 2004).

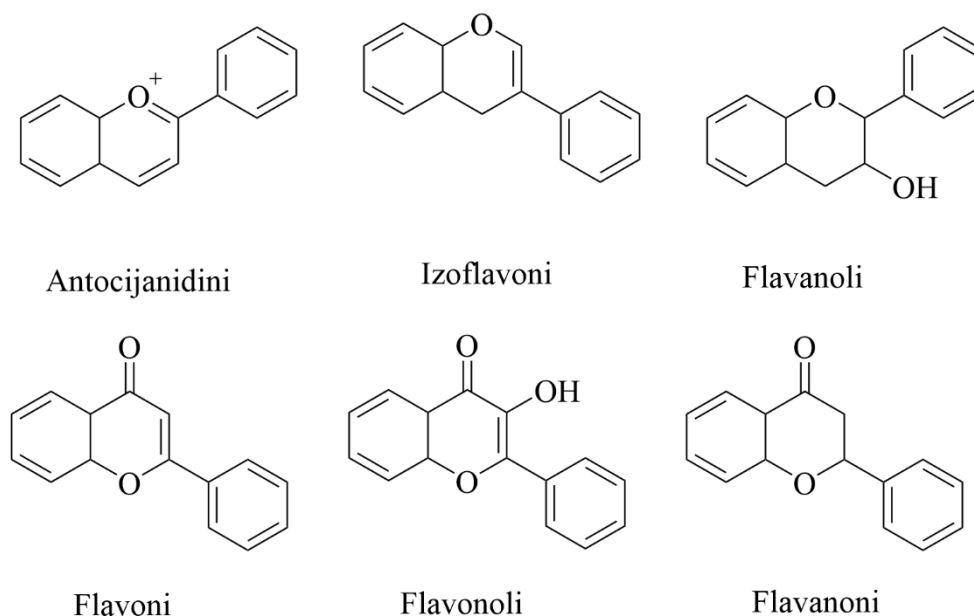


Slika 3. Kemijska struktura klorogenske kiseline.

Zbog svoje antioksidativne aktivnosti ima niz potencijalnih pozitivnih učinaka na zdravlje. Pokazuje antidijabetički, protutumorski, antihipertenzivni i protuupalni učinak te se zbog toga može koristiti u prevenciji i nefarmakološkoj terapiji brojnih kroničnih bolesti (Santana-Galvez i sur., 2017). S obzirom da je u hrani u obilju zastupljena, istraživanja povezana s novim terapijskim učincima od velikog su interesa. Najveće zanimanje usmjereno je na terapiju dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti. Naime, kliničkim ispitivanjima potvrđen je utjecaj na smanjenje inzulinske rezistencije i glikemijskog učinka hrane. Navedeno ju čini potencijalnim antidijabetikom (Meng i sur., 2013). Zaštitno djeluje i na kardiovaskularni sustav s učinkom na snižavanje krvnog tlaka u pacijenata s hipertenzijom (Naveed i sur., 2018). Zbog protuupalnog učinka i antioksidativne aktivnosti u mozgu, istražuje se potencijal u terapiji neurodegenerativnih bolesti i antiamnestički učinak (Veljkovic i sur., 2018).

1.2.2 Flavonoidi

Flavonoidi su velika podskupina polifenola koja sadrži više od 4000 strukturno različitih spojeva pronađenih u prirodi. Građom su kompleksniji od fenolnih kiselina; osnovni skelet im čine dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem, to jest 1,3-difenilpropan (C6-C3-C6). S obzirom na razlike u strukturi, ovisno o broju i položaju hidroksilnih skupina te stupnju nezasićenosti dijele se na podskupine: flavanole, flavanone, flavone, flavonole, izoflavone i antocijanidine (Pandey i sur., 2009., Slika 4). Zbog svoje strukture flavonoidi imaju snažnu antioksidativnu aktivnost. Hvataju slobodne radikale, keliraju metalne ione koji su uključeni u reakcije nastanka slobodnih radikala i sudjeluju u prevenciji peroksidacije (Miranda i sur., 2000).



Slika 4. Kemijske strukture derivata flavonoida.

U prirodi su najrasprostranjeniji flavoni i flavonoli, a zajedno s flavanonima, antocijanidinima i izoflavonima čine više od 80 % poznatih flavonoidnih spojeva (Vladimir-Knežević, 2017). Iz skupine flavonola valja napomenuti kvercetin, prisutan u gotovo svim biljnim proizvodima; voću, povrću, žitaricama, čaju i vinu (Manach i sur., 2004). Potvrđeno je da je unos kvercetina, obrnuto proporcionalan sa smrtnošću od koronarne bolesti srca

inhibicijom ekspresije metaloproteinaze 1 i razgradnjom aterosklerotskih plakova (Pandey i sur., 2009).

Flavonoidi su glavne obojene komponente cvjetova biljaka i obojene komponente u hrani. Osim za boju, odgovorni su i za okus, sprječavanje oksidacije masti i zaštitu vitamina i enzima. Većinom se pojavljuju kao glikozidi ili esteri s drugim spojevima kao što su alkoholi, steroli i masne kiseline (Kurtagić, 2017).

1.3 Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom napredna je tehnika ekstrakcije s velikim potencijalom za dobivanje fenolnih spojeva. Omogućuje visoku ponovljivost u kratkom vremenu, veće prinose bioaktivnih tvari, jednostavnije rukovanje, smanjenje temperature tijekom procesa, smanjenje količine otapala i manji utrošak energije (Wang i sur., 2006).

Ova se tehnika temelji na primjeni ultrazvuka visokog intenziteta i ograničene količine otapala kako bi se postigla učinkovita ekstrakcija. Koristi ultrazvučne valove niskih frekvencija; između 20 kHz i 100 kHz. Takvi valovi niske frekvencije, a visokog intenziteta, oštećuju stanične stijenke te tako omogućavaju bolje ispiranje staničnog sadržaja to jest učinkovitiju ekstrakciju. Naime, dolazi do pretvorbe ultrazvučne energije u mehaničku te to dovodi do lokaliziranog porasta tlaka i temperature koji uzrokuju kavitaciju, odnosno nastanak mjehurića, te posljedično oštećuju stanične membrane (Carreira-Casais i sur., 2021).

Bitni čimbenici u postupku ultrazvučne ekstrakcije su temperatura i izbor otapala. Općenito, povećanje temperature povećava prinos ekstrakcije, ali može i promijeniti sastav konačno ekstrahiranih sastavnica. Pažljiv izbor otapala potreban je zbog interakcije otapala s sastavnicama uzorka te posljedično kemijskom sastavu ekstrakta.

Pravilan odabir otapala, temperature i drugih parametara kao što su snaga ultrazvuka i količina uzorka bitno utječu na ekstrakciju. Iz tog razloga uvjeti moraju biti pažljivo odabrani kako bi se osigurao ekstrakt sa željenim značajkama (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Utjecaj takvih parametara na učinkovitost ekstrakcije polifenola ispitan je u ovom radu.

1.4 Ciklodekstrini

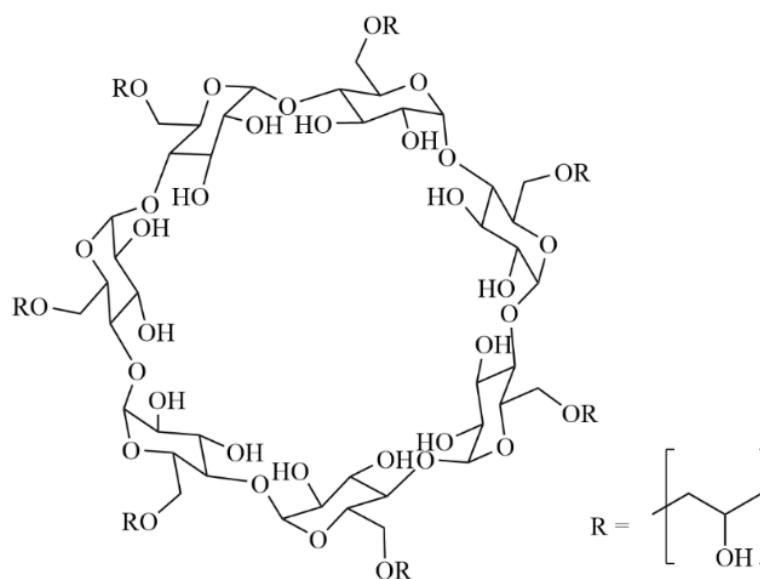
Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi sastavljeni od α -1,4-vezanih, 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica, nastali razgradnjom škroba pomoću glikoziltransferaze. CD s manje od 6 glukopiranoznih jedinica ne mogu nastati zbog steričkih smetnji, a oni s više od 8 se zbog nestabilnosti ne mogu koristiti za stvaranje inkluzijskih kompleksa. Svojom trodimenzionalnom strukturom tvore krnji stožac sa centralnom šupljinom u koju se s određenim afinitetima, mogu uklopiti razni spojevi (Cid-Samamed i sur., 2022). Unutrašnjost im lipofilnošću odgovara 50 % etanolu što ih čini idealnima za uklapanje spojeva koji su inače topljivi u navedenom otapalu. S druge strane, vanjska je površina hidrofilna i čini inkluzijske komplekse dobro topljivima u vodi. Zbog tih svojstava CD su našli svoje mjesto među proizvodima za primjenu na koži. Naime, slobodan lijek pokazuje veći afinitet za lipofilnu membranu nego za centralnu šupljinu CD te se zbog toga u značajnoj mjeri apsorbira u koži.

S obzirom na broj glukopiranoznih jedinica, dijelimo ih na α , β i γ CD koji se još razlikuju s obzirom na molarnu masu, topljivost u vodi i promjer centralne šupljine. Sve te razlike bitno određuju njihova svojstva. U praktičnoj primjeni najistaknutiji su β -CD te njihovi hidrofilni derivati poput (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina (2-HP- β -CD). Učinak CD na topljivost ovisi i o suotapalima koja ne smiju raditi komplekse s CD.

Njihova oralna i lokalna primjena je vrlo široka, no koriste se i u parenteralnim pripravcima (Jug, 2019). Nakon oralne primjene razgrađuju se u kolonu, a kod primjene na koži smanjuju rizik od iritacije i kontaktnog dermatitisa što opravdava njihovu sve širu uporabu. Osim istraživanja koja opravdavaju primjenu CD u kompleksima s lijekom (Miura i sur., 2012), proučavan je i učinak samih CD na koži. Postoji potencijal za primjenu u pripravcima za stariju kožu. Naime, dokazano je da metil- β -ciklodekstrin reverzibilno inhibira djelovanje kaveolina 1 (enzima koji regulira metabolizam kolagena), te tako stimulira sintezu kolagena i usporava starenje kože (Lee i sur., 2015).

1.4.1 (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin

2-HP- β -CD (Slika 5), hidrofilniji je derivat β -CD, koji se koristi za poboljšanje topljivosti raznih spojeva u vodi. Sadrži prosječno jednu hidroksipropilnu skupinu po glukopiranoznoj jedinici. Opseg i mjesto supstitucije mogu utjecati na strukturu šupljine CD molekule, a time i na mogućnosti molekularne inkapsulacije (Yong i sur., 2008).



Slika 5. Kemijska struktura (2-hidroksipropil)- β -hidroksiciklodekstrina.

Potencijal 2-HP- β -CD kao farmaceutski aktivne tvari opisan je u niz istraživanja, no bez konkretne primjene. Zbog svojstva da povećava topljivost kolesterola i smanjuje njegove stanične razine ispitivan je u terapiji Niemann-Pickove bolesti karakterizirane nesposobnošću skladištenja i metaboliziranja lipida. Brojna ispitivanja su davala obećavajuće rezultate, no nakon njegove primjene u praksi zaključeno je da se ipak ne preporuča osim uz pomno praćenje. Naime, nakon dugotrajne primjene zabilježen je proupalni učinak koji nakon kratkotrajne primjene nije opažen (Houben i sur., 2021). Trenutačno se ispituje kao potencijalni nosač protutumorskih lijekova (Peimanfard i sur., 2022).

Najširu primjenu i dalje ima kao pomoćno sredstvo u otapanju netopljivih i slabo topljivih spojeva. U preliminarnim ispitivanjima potvrđeno je da ima puno bolju sposobnost ekstrakcije polifenola od α -CD i (2-hidroksipropil)- γ -ciklodekstrina te je stoga korišten u ovom radu.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Smilje (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don) je tipična mediteranska biljka koja je unazad nekoliko godina, zahvaljujući farmakološkim učincima i *anti-age* svojstvima ekstrakata, potaknula novi interes farmaceutske i kozmetičke industrije. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ekstrakcijskih uvjeta (snage ultrazvuka, mase droge, temperature, sadržaja glicerola i mliječne kiseline) na sadržaj različitih vrsta polifenola smilja te optimirati proces ekstrakcije. Korištena je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz inkapsulaciju u 2-HP- β -CD kako bi se ostvario ekološki prihvatljiv način ekstrakcije, odnosno bolji prinos i kraće ekstrakcijsko vrijeme.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Biljni materijal

Za ispitivanje je korištena je zelen biljne vrste *Helichrysum italicum*. Ispitivani uzorci prikupljeni su u Biogradu. Nakon branja, droga je čuvana na -20 °C te je neposredno prije ispitivanja usitnjena u prah.

3.1.2 Kemikalije

U ispitivanju su korištene sljedeće kemikalije: galna kiselina, kvercetin dihidrat, kavena kiselina, 2-HP- β -CD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i mliječna kiselina (Merck, Darmstadt, Germany). Ostali korišteni reagensi i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.3 Uređaji

U ispitivanju su korišteni sljedeći uređaji: precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), UV/Vis, čitač mikrotitarskih pločica (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) i tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (engl. HPLC) Agilent 1200 opremljen autosamplerom, DAD detektorom i Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 25 mm \times 4,6 mm) kolonom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.2 Metode

3.2.1 Ultrazvučna ekstrakcija

U Erlenmeyerove tikvice zapremnine 50 mL odvađnut je u prah usitnjeni biljni materijal u količinama navedenim u Tablici 1. Neposredno prije početka ultrazvučne ekstrakcije, biljnom materijalu u tikvicama dodano je ukupno 10 g odgovarajućeg ekstrakcijskog otapala i 0,6 mmol 2-HP- β -CD (0,8376 g). Ekstrakcijski uvjeti su bili sljedeći: snaga ultrazvuka (144-720 W), temperatura (30-70 °C), udio mliječne kiseline (0-2 %), masa droge (0,3-0,6 g) i udio glicerola (0-5 %) kako su navedeni u Tablici 1. Ostatak ekstrakcijskog otapala do 100 % je činila voda. Postupak je trajao 30 min. Neposredno nakon ekstrakcije, vrući ekstrakti filtrirani su kroz naborani filter papir u vijale te zatim pohranjeni na 4 °C.

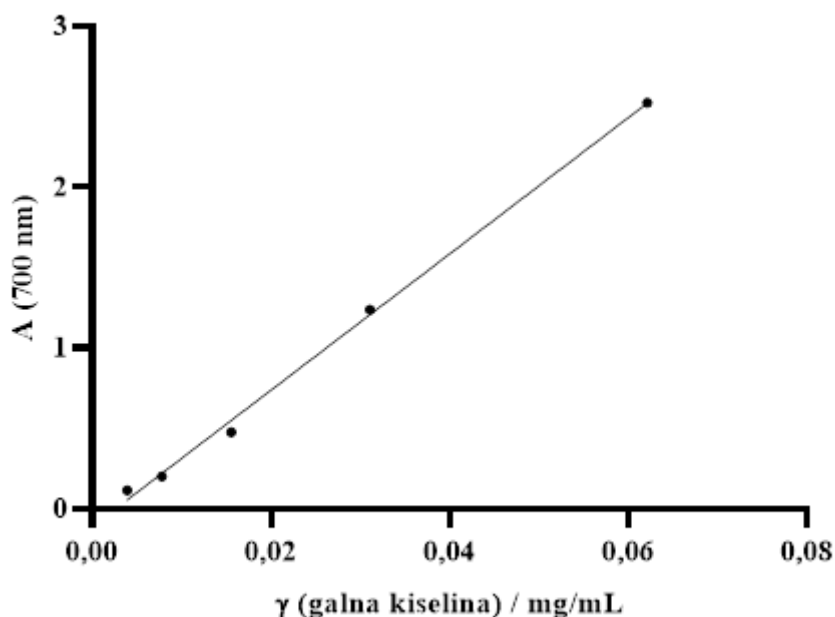
Tablica 1. Prikaz naziva i uvjeta pripreme ekstrakata.

Naziv ekstrakta	USP (W)	T (°C)	MK (%)	MD (g)	GL (%)
E1	144	30	0	0.3	5
E2	720	70	0	0.3	5
E3	720	70	2	0.3	0
E4	720	30	0	0.3	0
E5	720	30	2	0.6	0
E6	144	70	2	0.3	5
E7	144	30	2	0.6	5
E8	720	70	2	0.6	5
E9	144	30	0	0.6	0
E10	720	30	0	0.6	5
E11	144	70	2	0.6	0
E12	720	70	0	0.6	0
E13	144	30	2	0.3	0
E14	720	30	2	0.3	5
E15	144	70	0	0.3	0
E16	144	70	0	0.6	5

USP = snaga ultrazvuka, T = temperatura, MK = mliječna kiselina, MD = masa droge i GL = glicerol.

3.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

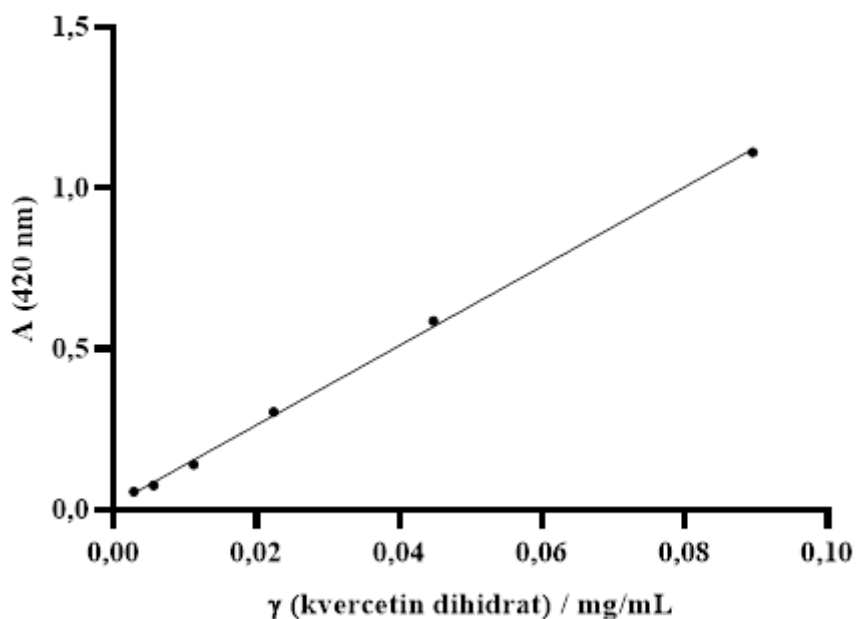
Sadržaj ukupnih polifenola određen je korištenjem modificirane Folin-Ciocalteu kolorimetrijske metode na mikrotitarskoj pločici (Marijan i sur., 2022). Folin-Ciocalteu reagens razrijeđen je s vodom u omjeru 1:3. U jažice na mikrotitarskoj pločici je otpipetirano 80 μL otopine ekstrakta kojem je dodano 80 μL 10 %-tne otopine Na_2CO_3 i 80 μL Folin-Ciocalteu reagensa, tim redoslijedom. Reakcijska smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon sat vremena, mjerenje apsorbancije provedeno je na 700 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra. Sadržaj polifenola u ekstraktima određen je na temelju baždarnog pravca galne kiseline (0,412 mg/mL, Slika 6) prema jednadžbi $y = 42,37x - 0,11$ (x je masena koncentracija standarda, a y apsorbancija pri 700 nm) s visokim stupnjem linearnosti ($r^2 = 0,9975$). Rezultati su prikazani kao ekvivalenti galne kiseline u miligramima po mililitru ekstrakta (mg/mL). Mjerenje apsorbancije ekstrakata provedeno je u triplikatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.



Slika 6. Baždarni pravac galne kiseline za određivanje sadržaja ukupnih polifenola.

3.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

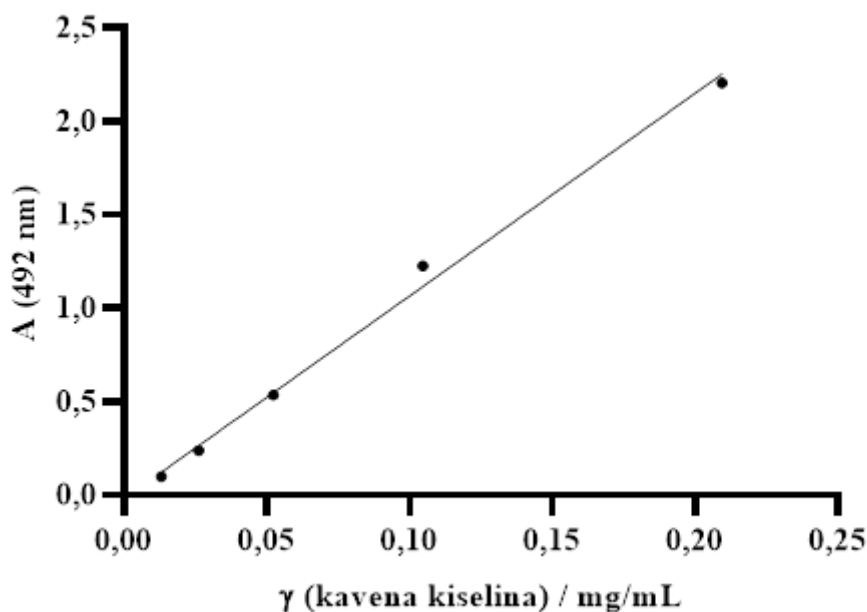
Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je korištenjem modificirane kolorimetrijske metode (Kumazawa i sur., 2004). U jažice na mikrotitarskoj pločici otpipetirano je 120 μL metanolne otopine ekstrakta i 120 μL 0,2 %-tne metanolne otopine AlCl_3 . Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon sat vremena, mjerenje apsorbancije provedeno je pomoću UV/Vis spektrofotometra na 420 nm. Flavonoidi u ekstraktima određeni su pomoću baždarnog pravca kvercetin dihidrata (0,20 mg/mL, Slika 7) prema jednadžbi $y = 12,33x - 0,02$ (x je masena koncentracija standarda, a y apsorbancija pri 420 nm) s visokim stupnjem linearnosti ($r^2 = 0,9989$). Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta kvercetin dihidrata u mililitru ekstrakta (mg/mL). Mjerenje apsorbancije ekstrakata provedeno je u triplikatu, a rezultati su izraženi kao njihova aritmetička sredina.



Slika 7. Baždarni pravac kvercetin dihidrata za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida.

3.2.4 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje ukupnih fenolnih kiselina provedeno je korištenjem spektrofotometrijske metode s nitrit-molibdatom (Nicolle i sur., 2004). U jažice na mikrotitarskoj pločici otpipetirano je 100 μL otopine uzorka, 50 μL otopine HCl-a (0,5 M), 50 μL nitrit-molibdat reagensa i 50 μL 8,5 %-tne otopine NaOH. Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon 15 minuta mjerenje apsorbancije provedeno je pomoću UV/Vis spektrofotometra na 492 nm. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina određen je pomoću baždarnog pravca kavene kiseline (0,57 mg/mL, Slika 8) prema jednadžbi $y = 10,85x - 0,02$ (x je masena koncentracija standarda, a y apsorbancija pri 492 nm) s visokim stupnjem linearosti ($r^2 = 0,9949$). Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta kavene kiseline u mililitru ekstrakata (mg/mL). Mjerenje apsorbancije ekstrakata provedeno je u triplicatu, a rezultati izraženi kao njihova aritmetička sredina.



Slika 8. Baždarni pravac kavene kiseline za određivanje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina.

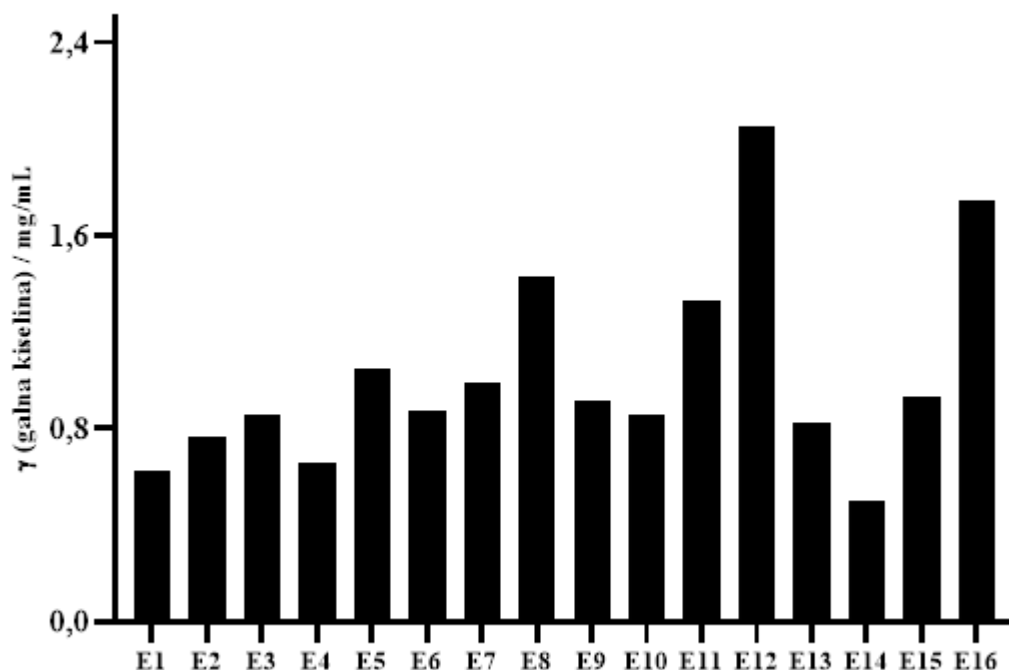
3.2.5 Kvantifikacija klorogenske kiseline korištenjem HPLC-a

Ekstrakti i standard klorogenske kiseline (0,2 mg/mL) filtrirani su prije ispitivanja kroz 0,45 µm PTFE filtere za šprice (CHROMAFIL Xtra PTFE, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). U ispitivanju je korištena modificirana literaturno opisana metoda (Kramberger i sur., 2020). Kao otapalo A korištena je smjesa vode i mravlje kiseline u omjeru 98:2 dok je kao otapalo B korištena smjesa acetonitrila, metanola i vode u omjeru 49:49:2. Navedena otapala primijenjena su na sljedeći način: 0–15 min, 2-100 % B; 15-20 min, 100 % B; 20-26 min, 100-2 % B. Ostatak do 100 % čini otapalo A. Odvajanje je postignuto pri 40 °C i protoku od 1,0 mL/min. Sadržaj klorogenske kiseline određen je pri valnoj duljini od 330 nm. Kvantifikacija je provedena prema prethodno konstruiranom baždarnom pravcu, $y = 309613x + 3,00$ (y = površina ispod krivulje na kromatogramu, x = masa standarda klorogenske kiseline u mg), te je izražena kao miligrami po mililitru ekstrakta (mg/mL) s visokim stupnjem linearnosti ($r^2 = 1,0000$). Identifikacija se temelji na usporedbi retencijskog vremena i UV spektra na kromatogramu uzorka s onima standarda.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Određivanje ukupnih polifenola

Biljni ekstrakti bogati biološki aktivnim polifenolnim spojevima važni su zbog antioksidativnog učinka navedenih spojeva. Zahvaljujući izrazitom antioksidativnom učinku i sposobnosti sprečavanja negativnog utjecaja UV zračenja, preparati bogati polifenolima primjenjuju se u cijelom nizu medicinskih proizvoda. Osim kao aktivne sastavnice, mogu se koristiti i kao pomoćne komponente gotovih oblika jer sprječavaju oksidaciju aktivnih sastavnica i ostalih pomoćnih tvari čime produžuju trajanje lijekova, kozmetičkih i drugih proizvoda (de Lima Cherubim i sur., 2020). Koncentracija ukupnih polifenola određena je spektrofotometrijskom metodom te su rezultati međusobno uspoređeni (Slika 9) u svrhu određivanja optimalnih ekstrakcijskih uvjeta.



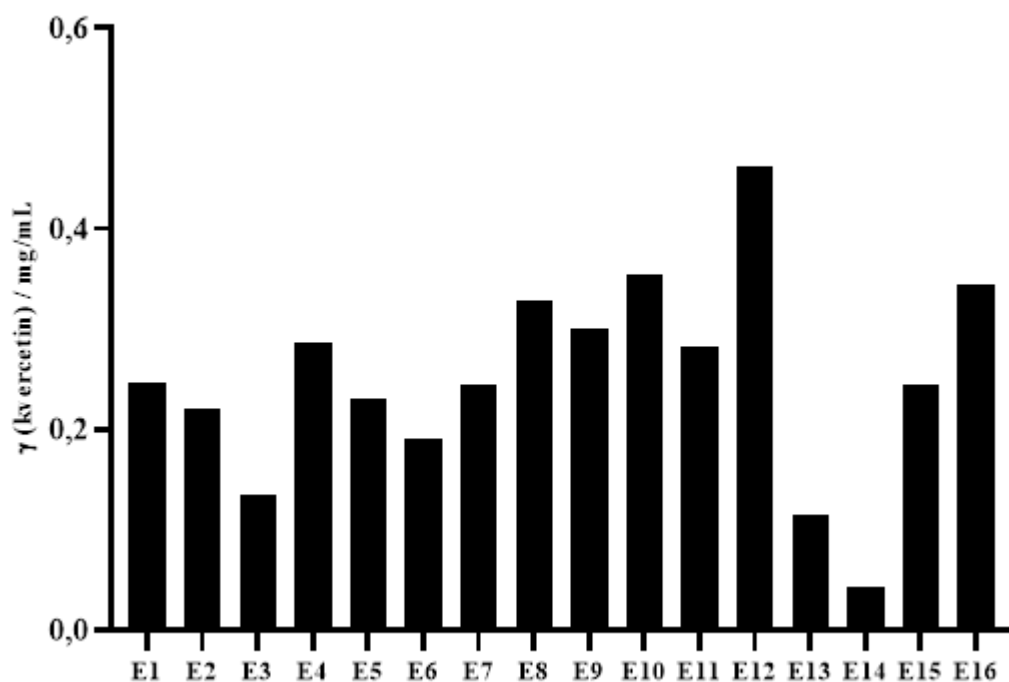
Slika 9. Usporedba koncentracija ukupnih polifenola u ekstraktima E1-E16. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

Brojevne vrijednosti koncentracija svih ekstrakata navedene su u prilogu (Tablica P1). Vidljivo je da E12, vodeni ekstrakt, ima najbolji prinos polifenola izraženih u ekvivalentima galne kiseline (2,057 mg/mL). Njega slijede ekstrakti E16 (1,744 mg/mL) i E8 (1,430 mg/mL) sa značajno, čak 10-30 % manjim prinosom. Uspoređujući ekstrakcijske uvjete prema prinosu ekstrakcije može se zaključiti da su za ekstrakciju najvažniji parametri; temperatura i masa droge. To se može potvrditi i promatranjem prinosom najlošija tri ekstrakta (E1, E4 i E14) ispitana pri nižoj temperaturi i masi droge sa do 76 % manjim prinosom od E12. Može se zaključiti da je ekstrakcija polifenola pri takvim uvjetima praktično neisplativa. Ipak, usporedbom koncentracija ekstrakata koji se razlikuju samo u dva parametra (masom droge i temperaturom) na primjer E9 i E15 ili E2 i E10 ne može se utvrditi koji je parametar od prije spomenuta dva, od većeg značaja. Potrebno je provesti više mjerenja i dodatna statistička analiza da bi se sa sigurnošću mogli donijeti zaključci.

Može se primijetiti kako je snaga ultrazvuka od umjerenog značaja no ona omogućava provođenje ekstrakcije pri nižim temperaturama istom efikasnošću tako da zasigurno indirektno djeluje na sveukupni prinos ukupnih polifenola. Iz raspršenosti rezultata ne može se sa sigurnošću utvrditi utjecaj udjela mliječne kiseline na ekstrakciju. Može se primijetiti kako udio mliječne kiseline smanjuje prinose za ekstrakte s većom masom droge nastale pri višoj temperaturi. Ipak, prinosom najbolji ekstrakti nastali pri nižoj temperaturi sadrže veći udio mliječne kiseline (E5 i E7). Može se zaključiti da se ovisno o ostalim uvjetima ekstrakcije mora prilagoditi sadržaj mliječne kiseline te će ovisno o njima povećati ili smanjiti prinos. Svakako, prinosi su pri nižoj temperaturi unatoč povećanju udjela mliječne kiseline, značajno manji od E12, čak i do 49 %. Značaj udjela glicerola se zbog raspršenosti rezultata ne može odrediti bez statističke analize. Literaturno dostupni izvori koncentraciju polifenola izražavaju kao miligrame ekvivalenata galne kiseline po gramu droge (mg/g) dok su u ovome radu koncentracije izražene kao miligrami galne kiseline po mililitru ekstrakta (mg/mL). Uzevši u obzir da je gustoća ekstrakata nepoznata, ekstrakte nije moguće izravno usporediti. Analizom literaturno dostupnih podataka najčešće korištena otapala za ekstrakciju relativno polarna otapala kao etanol i 80 % metanol. U navedenim otapalima koncentracija polifenola iznosila je 104,8 mg/g za 50 % etanol, 132,1 mg/g za 96 % etanol (Molnar i sur., 2017) i 138,62 mg/g za 80 % metanol (Goncalves i sur., 2016).

4.2 Određivanje ukupnih flavonoida

Biljni ekstrakti koji sadrže visoki udio flavonoida koriste se u cijelom nizu proizvodnih procesa u kozmetičkoj i srodnim industrijama (Arct I Pytkowska, 2008). Sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom te su rezultati uspoređeni međusobno (Slika 10, Tablica P1) u svrhu određivanja najboljih ekstrakcijskih uvjeta.



Slika 10. Usporedba koncentracija flavonoida u ekstraktima E1-E16. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

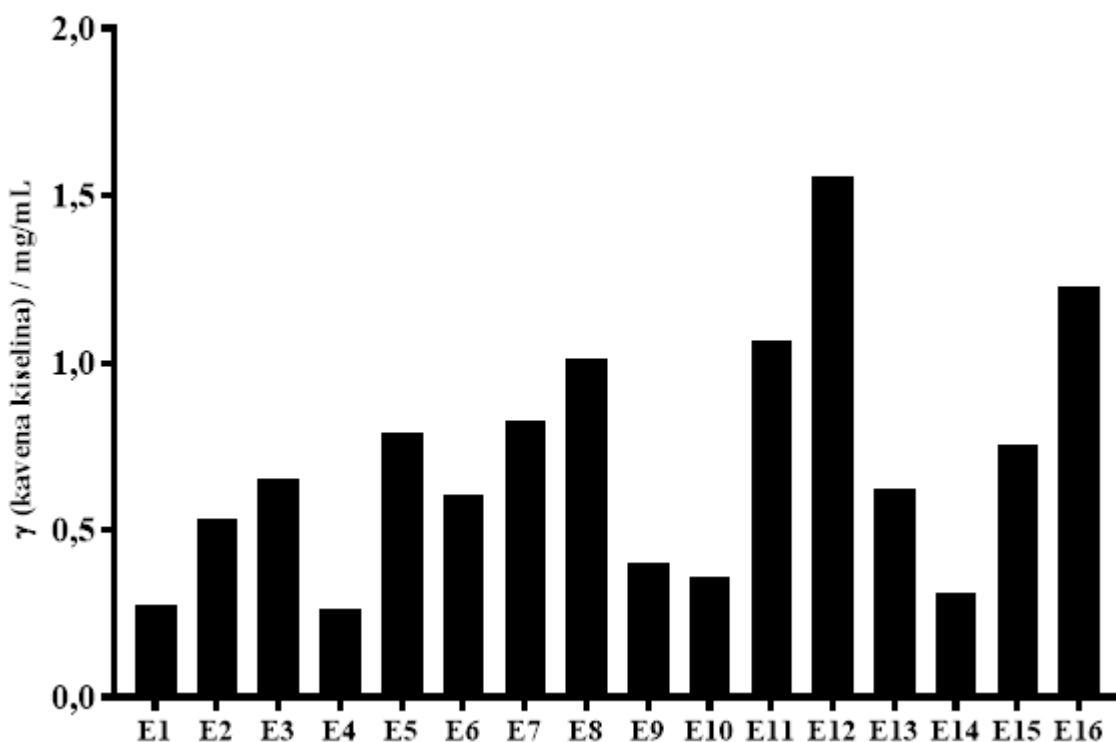
Najbolji uvjeti ekstrakcije su i u ovom slučaju neosporno; snaga ultrazvuka 720W, temperatura 70 °C, voda kao otapalo te masa droge 0,6 g, to jest E12 (0,463 mg/mL). Vrijednosti koncentracije za sve ekstrakte nalaze se u prilogu (Tablica P1). Ipak, za razliku od prethodnog i sljedećih ispitivanja, ističe se E10 (0,354 mg/mL). Naime, po prinosu ekstrakcije nalazi se odmah iza E12, iako je za 20 % niže koncentracije. Ono što se u ovom ispitivanju značajno razlikuje od ispitivanja ostalih sastavnica je puno manji značaj temperature u sveukupnom prinosu. S obzirom da su flavonoidi u smilju zastupljeni u vrlo niskim koncentracijama u usporedbi s ostalim polifenolima, prinos flavonoida je i u ovom slučaju vrlo

nizak. Točnost rezultata može se potvrditi mjerenjima koncentracije polifenola gdje se može primijetiti da je E10 među lošijim ekstraktima po prinosu polifenola čime se potvrđuje vrlo niska koncentracija flavonoida u ukupnom sadržaju polifenola smilja. Može se istaknuti i ekstrakt E4 (0,286 mg/mL) koji potvrđuje temperaturu kao manje značajan parametar i nalazi se među boljim ekstraktima za razliku od ispitivanja polifenola gdje je prinosom među lošijima Time se još jednom potvrđuje točnost rezultata i niska koncentracija flavonoida u ukupnom sadržaju polifenola. Može se primijetiti kako su najlošiji ekstrakti nastali postupkom ekstrakcije uz mliječnu kiselinu (E3, E6, E13 i E14). Ostali ekstrakti koji ju sadrže, a nalaze se među prinosom boljim ekstraktima, ekstrahirani su u uvjetima veće mase droge (0,6 g) što još jednom upućuje na značaj tog parametra. Pokazalo se da glicerol nema značajan utjecaj na ekstrakciju, no ipak primjetno je da kombinacija višeg udjela glicerola i mliječne kiseline, snižava prinose za 29-90 % dok sam glicerol nema značajan učinak. Zaključuje se na temelju E6, E7, E8 i E14 u usporedbi sa E12. Također, usporedivši ekstrakte E8, E11 i E12 nastale u uvjetima više temperature, mase droge i snage ultrazvuka, može se primijetiti da dodatak suotapala kao što su glicerol i/ili mliječna kiselina smanjuje prinose za 29-39 %. S obzirom da se flavonoidi u smilju već nalaze u vrlo malim koncentracijama, ekstrakciju u ovakvim uvjetima nema smisla provoditi.

Iz svega navedenog, može se zaključiti kako je ključan parametar u ekstrakciji, masa droge. Iako temperatura ima značajan utjecaj, zbog ekstrakta E10 se bez statističke analize ne može donijeti adekvatan zaključak. Za određivanje značaja udjela glicerola također je potrebna statistička analiza. Nadalje, nepoželjan je dodatak mliječne kiseline što se posebno vidi u uvjetima niže mase droge. Koncentracija flavonoida u ovome je radu izražena kao miligrami ekvivalenata kvercetina po mililitru ekstrakta (mg/mL) dok je u literaturi izražena kao miligrami aktivne tvari po gramu droge (mg/g) te se podaci ne mogu izravno usporediti radi prije navedenih razloga. U literaturi se za ekstrakciju najčešće koriste otapala poput 45 % etanola. Određena koncentracija u takvom otapalu iznosi 20,68 mg/g (Kladar i sur., 2015). Valja napomenuti da su u literaturi flavonoidi u smilju nastali ekstrakcijom polarnim otapalima nekada zastupljeni u većoj količini od fenolnih kiselina, a nekada u manjoj. S obzirom da sastav ekstrakata ovisi o uvjetima rasta, staništu i vremenu branja smilja, rezultati u svakom slučaju ne mogu biti potpuno usporedivi.

4.3 Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Fenolne kiseline sintetiziraju biljke kao jedan od odgovora na oksidacijski stres, u svrhu zaštite od nepovoljnih vanjskih učinaka poput različitih insekata i mikroorganizama. Zahvaljujući istaknutom antioksidativnom učinku, koji se temelji na uklanjanju slobodnih radikala i vezanju metalnih iona koji iniciraju nastanak slobodnih radikala, sastavnice su brojnih kozmetičkih i medicinskih proizvoda. Masene koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima E1-E16 izražene su kao ekvivalenti kavene kiseline (mg/mL). Međusobna usporedba masenih koncentracija fenolnih kiselina prikazana je Slici 11 dok se brojčane vrijednosti za svaki navedeni ekstrakt nalaze u Tablici P1.



Slika 11. Usporedba koncentracija ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima E1-E16. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

Ekstrakt koji sadrži najveću koncentraciju fenolnih kiselina je i u ovom slučaju E12 (1,557 mg/mL). Vrijednosti koncentracija ostalih ekstrakata prikazani su u prilogu (Tablica P1). Najbolja ekstrakcija postiže se u uvjetima snage ultrazvuka 720 W, temperature 70 °C, vodom

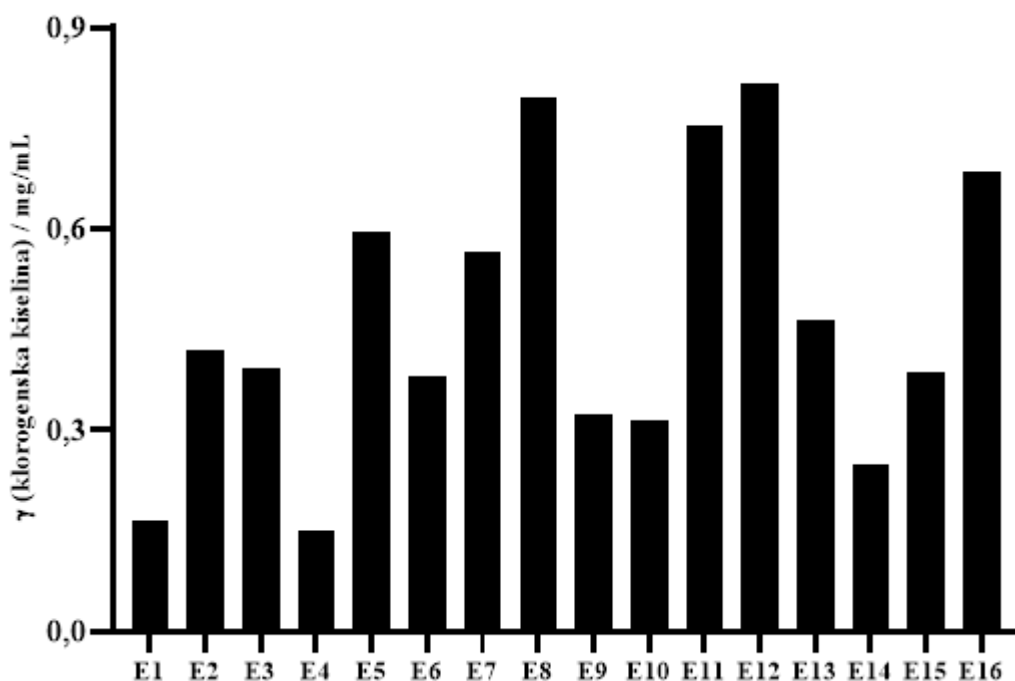
kao otapalom te masom droge od 0,6 g što čini rezultate u korelaciji sa do sad dobivenima. Bitno je naglasiti utjecaj mliječne kiseline koja pospješuje ekstrakciju fenolnih kiselina. Utjecaj je posebno vidljiv u ekstraktima E5 i E7 priređenima pri nižoj temperaturi (30 °C) i većoj masi (0,6 g). Ispitivanje polifenola potvrđuje iste rezultate, što dokazuje visoku koncentraciju fenolnih kiselina u uzorku smilja. Na primjeru fenolnih kiselina najuočljiviji je značaj temperature na ekstrakciju. S obzirom da podaci nisu u tolikoj mjeri raspršeni, vidljivo je da su najbolji ekstrakti (E8, E11, E12 i E16) nastali u uvjetima veće temperature dok su oni najlošiji (E1, E4, E9, E10 i E14) pri nižoj temperaturi. Ostali ekstrakti odstupaju od tog pravila ponajviše zbog mase i koncentracije mliječne kiseline pri nižim temperaturama.

Rezultati upućuju na to da na ekstrakciju indirektno utječe snaga ultrazvuka, dok dodatak glicerola gotovo da i nema utjecaja. Iz prinosom najbogatijih ekstrakata (E11, E12 i E16) može se zaključiti kako su najbitniji parametri u ekstrakciji masa droge i temperatura, a ako se ekstrakcija provodi pri nižim temperaturama, dodatak mliječne kiseline može povećati prinos (E5 i E7) fenolnih kiselina, slično kao i kod prinosa polifenola. Koncentracija fenolnih kiselina u ovome je radu izražena kao miligrami ekvivalenta kavene kiseline po mililitru ekstrakta (mg/mL) dok je u literaturi izražena kao miligrami aktivne tvari po gramu droge (mg/g) pa neposredna usporedba nije moguća. Analizom literaturno dostupnih podataka, najčešće korištena otapala za ekstrakciju su polarna i relativno polarna otapala poput 45 % etanola i metanola. S obzirom da u literaturi većinom nije navedena ukupna koncentracija fenolnih kiselina izražena u ekvivalentima kavene kiseline već su one navedene pojedinačno, za usporedbu je korišten najbliži rad. Naime, ultrazvučnom ekstrakcijom smilja u metanolu određena je koncentracija fenolnih kiselina 1,4 mg/g (Weglaz i sur., 2022).

4.4 Kvantifikacija klorogenske kiseline korištenjem HPLC-a

Klorogenska kiselina je fenolna kiselina od velikog interesa za kozmetičku industriju. Novija istraživanja ispitivana na kulturi stanica kože i kose potvrđuju značajan utjecaj klorogenske kiseline (0,2 mg/ mL) na proliferaciju stanica, jednog i drugog tipa. Navedeno može predstavljati temelj za istraživanja potencijala upotrebe u zarastanju rana, u anti-age proizvodima te pripravcima za poticanje rasta kose. Metoda ekstrakcije klorogenske kiseline iz biljnih izvora mora biti učinkovita kako bi jamčila minimalnu potrebnu koncentraciju za ispoljavanje takve biološke aktivnosti (Saewan, 2022). Masena koncentracija klorogenske kiseline u uzorcima određena je korištenjem HPLC-a kako je to opisano u poglavlju 3.2.5.

Rezultati provedenih analiza ekstrakata i njihova međusobna usporedba prikazani su na Slici 12 i Tablici P1.



Slika 12. Usporedba koncentracija klorogenske kiseline u ekstraktima E1-E16. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

Može se primijetiti kako ekstrakt E12 sadrži najveću koncentraciju klorogenske kiseline (0,816 mg/mL) i u ovom slučaju radi se o istom vodenom ekstraktu. Rezultati su u korelaciji sa ispitivanjem koncentracije fenolnih kiselina. Zanimljivo je i ovdje primijetiti da je vodeni ekstrakt E12 prinosom najbolji, dok je vodeni ekstrakt E4 s 0,149 mg/mL klorogenske kiseline, prinosom najlošiji. Iz takvih podataka možemo zaključiti o velikom značaju temperature i mase, unatoč otapalu, na sveukupni prinos ekstrakcije. Također, ekstrakt E8 (0,795 mg/mL) nastao pri uvjetima većeg udjela mliječne kiseline i glicerola od ekstrakta E12 pokazuje samo 3 % manji prinos. Tu se nalazi i potencijal za buduća istraživanja, no na osnovu ostalih parametara može se potvrditi da su temperatura i masa droge značajniji parametri od sastava otapala. Također, s obzirom da E11 osigurava za manje od 8 % niže prinose od najboljeg ekstrakta valja ga uzeti u obzir kod procjene povoljnih ekstrakcijskih uvjeta. Sva tri ekstrakta su nastala u uvjetima visoke temperature, veće mase droge i snage ultrazvuka. Zbog raspršenosti rezultata ekstrakata nastalih pri većoj snazi ultrazvuka, bez statističke analize ne može se utvrditi značaj

tog parametra. Zanimljivo je primijetiti kako E8 ima 35 % manji prinos fenolnih kiselina od E12 iz čega se može zaključiti da ostale fenolne kiseline prisutne u uzorku imaju različite preferirane uvjete ekstrakcije od klorogenske kiseline te potencijalno veći utjecaj otapala na ekstrakciju. Mliječna kiselina značajno pospješuje ekstrakciju pri nižoj temperaturi što se vidi iz ekstrakata E5, E7 i E13 te se u uvjetima niže temperature može upotrijebiti u svrhu povećanja prinosa. Glicerol gotovo nema utjecaja na ekstrakciju. Literaturno dostupni izvori, koncentraciju klorogenske kiseline prikazuju kao miligrame aktivne tvari po gramu droge (mg/g) dok su u ovome radu koncentracije izražene kao miligrami aktivne tvari po mililitru ekstrakta (mg/mL). S obzirom da je gustoća ekstrakata nepoznata, izravna usporedba koncentracija nije moguća. Za usporedbu je izabran ekstrakt nastao u uvjetima najsličnijima onima u ovome radu. Analizom literaturno dostupnih podataka vodenih ekstrakata smilja nastalih ultrazvučnom ekstrakcijom, koncentracija klorogenske kiseline iznosila je 4 mg/g. Ekstrakcija je provedena pri visokoj temperaturi, 100°C (Kramberger i sur., 2020).

5. ZAKLJUČAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je optimizirati uvjete ekstrakcije u cilju dobivanja najvećeg prinosa polifenola na ekološki prihvatljiv način. Kao sredstvo za povećanje topljivosti bioaktivnih tvari korišteni je 2-HP- β -CD koji je u preliminarnim ispitivanjima pokazao značajan utjecaj na poboljšanje prinosa ekstrakcije.

Najbogatiji izvor ukupnih polifenola te svih podskupina polifenola je neosporno E12; ekstrakt dobiven pri temperaturi 70 °C, uz masu droge 0,6 g, snagom ultrazvuka 720 W te s vodom kao otapalom. Visoka temperatura (70 °C) i veća masa droge (0,6 g) najznačajnije utječu na prinos ekstrakcije, za sve ispitivane sastavnice osim flavonoida za koje je značajnija masa droge. Snaga ultrazvuka indirektno utječe na efikasnost. Koncentracija glicerola je gotovo irelevantna za ekstrakciju svih sastavnica. Mliječna kiselina ima pozitivan utjecaj na prinos fenolnih kiselina posebno pri nižoj temperaturi, ali negativno utječe na prinos flavonoida. Potrebno je provesti statističku analizu kako bi se točnije utvrdila relevantnost tog, i ostalih parametara. Za konkretnije zaključke mogu se provesti dodatna ispitivanja s većim brojem ekstrakata.

S obzirom da su dva najvažnija parametra temperatura i masa droge, potencijal za buduća istraživanja nalazi se u njihovom eksperimentalnom utvrđivanju.

6. LITERATURA

Arct J, Pytkowska K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin Dermatol*, 2008, 26, 347-357.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99, 191-203.

Bilandžija L, Bilandžija B, Pollak L, Inić S. Kemijski sastav, biološka aktivnost i primjena smilja u medicini i farmaciji. *Farm Glas*, 2022, 78, 229-248.

Carreira-Casais A, Otero P, Garcia-Perez P, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Carpena M, Soria-Lopez A, Simal-Gandara J, Prieto MA. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18, 9153.

Chaudhari SM, Badole SL. Polyphenols in Human Health and Disease. Academic Press, 2014, str. 723.

Cid-Samamed A, Rakmai J, Mejuto JC, Simal-Gandara J, Astray G. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chem*, 2022, 384, 132467.

Combes C, Legrix M, Rouquet V, Rivoire S, Grasset S, Cenizo V, Moga A, Portes, P. *Helichrysum italicum* essential oil prevents skin lipids peroxidation caused by pollution and UV. *J Invest Dermatol*, 2017, 137, 221.

de Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L, da Silva de Lucca RA. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19, 33-37.

Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol*, 2010, 2, 22-33.

El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *Int J Food Sci Technol*, 2009, 44, 2512-2518.

Fraternale D, Flamini G, Ascrizzi R. In Vitro Anticollagenase and Antielastase Activities of Essential Oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don. *J Med Food*, 2019, 22, 1041-1046.

Goncalves S, Moreira E, Grosso C, Andrade PB, Valentao P, Romano A. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *J Food Sci Technol*, 2017, 54, 219-227.

Houben T, Yadati T, de Krujif R, Gijbels MJJ, Luiken JJFP, van Zandvoort M, Kapsokalyvas D, Lütjohann D, Westerterp M, Plat J, Leake D, Shiri-Sverdlov R. Pro-Inflammatory Implications of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Treatment. *Front Immunol*, 2021, 12, 716357.

Jug M. Oblikovanje lijekova, Ciklodekstrini. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2019, str. 2-20.

Kako uzgojiti smilje?, 2016., <https://gospodarski.hr>, pristupljeno 30. 9. 2022.

Kenig S, Kramberger K, Novak KS, Karnjus I, Bandelj D, Petelin A, Praznikar ZJ. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don and *Helichrysum arenarium* (L) Moench infusions in reversing the traits of metabolic syndrome: a double-blind randomized comparative trial. *Food Funct*, 2022, 13, 7697-7706.

Kladar NV, Anačkov GT, Rat MM, Srđenović BU, Grujić NN, Šefer EI, Božin BN. Biochemical Characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical Screening, Chemotaxonomy, and Antioxidant Properties. *Chem Biodivers*, 2015, 12, 419–431.

Kramberger K, Barlič-Maganja D, Bandelj D, Baruca Arbeiter A, Peeters K, Miklavčič Višnjevac A, Jenko Pražnikar Z. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species. *Metabolites*, 2020, 10, 403.

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

Kurtagić H. Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2017, 6, 28-35.

Lee JA, Choi DI, Choi JY, Kim SO, Cho KA, Lee JB, Yun SJ, Lee SC. Methyl- β -cyclodextrin up-regulates collagen I expression in chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity. *Oncotarget*, 2015, 10, 1947-1953.

Maksimovic S, Tadic V, Skala D, Zizovic I. Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry*, 2017, 138, 9-28.

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

Marijan M, Mitar A, Jakupović L, Prlić Kardum J, Zovko Končić M. Optimization of Bioactive Phenolics Extraction and Cosmeceutical Activity of Eco-Friendly Polypropylene-Glycol–Lactic-Acid-Based Extracts of Olive Leaf. *Molecules*, 2022, 27, 529.

Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:801457.

Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *J Agric Food Chem*, 2000, 48, 3876-3884.

Miura T, Takada A, Ooe M. Tretinoin Cyclodextrin Complex (RA/CyD) Causes Less Irritation with an Equal Antiwrinkle Effect Compared with Conventional Tretinoin: Clinical and Histologic Studies of Photoaged Skin. *Aesthetic Plast Surg*, 2012, 36, 971-981.

Molnar M, Jerković I, Suknović D, Bilić Rajs B, Aladić K, Šubarić D, Jokić S. Screening of Six Medicinal Plant Extracts Obtained by Two Conventional Methods and Supercritical CO₂ Extraction Targeted on Coumarin Content, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity and Total Phenols Content. *Molecules*, 2017, 22,348.

Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, XiaoHui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97, 67-74.

Nicolle C, Carnat A, Fraisse D, Lamaison J, Rock E, Michel H, Amoroux P, Remesy C. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *J Sci Food Agric*, 2004, 84, 2061-2069.

Ninčević T, Grdiša M, Šatović Z, Jug-Dujaković M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Ind Crops Prod*, 2019, 138, 111487.

Nostro A, Bisignano G, Cannatelli M, Crisafi G, Germano M, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 17, 517-520.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.

Peimanfard S, Zarrabi A, Trotta F, Matencio A, Cecone C, Caldera F. Developing Novel Hydroxypropyl- β -CyclodextrinBased Nanosponges as Carriers for Anticancer Hydrophobic Agents: Overcoming Limitations of Host–Guest Complexes in a Comparative Evaluation. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 1059.

Primitivo MJ, Neves M, Pires CL, Cruz PF, Brito C, Rodrigues AC, de Carvalho CCCR, Mortimer M, Moreno MJ, Brito RMM, Taylor EJ, Milson SH, Reboredo F, Campos MJ, Vaz DC, Ribero VS. Edible flowers of *Helichrysum italicum*: Composition, nutritive value, and bioactivities. *Food Res Int*, 2022, 157, 111399.

Rajić M, Bilić M, Aladić K, Šimunović D, Pavković T, Jokić T. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja. *Glas zašt bilja*, 2015, 6, 16-26.

Saewan N. Effect of Coffee Berry Extract on Anti-Aging for Skin and Hair—In Vitro Approach. *Cosmetics*, 2022, 9, 66.

Santana-Galvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velazquez DA. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*, 2017, 22, 358.

Shivashankara KS, Acharya SN. Bioavailability of Dietary Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. *Open Nutraceuticals J*, 2010, 3, 227-241.

Veljkovic E, Xia W, Phillips B, Wong ET, Ho J, Oviedo A, Hoeng J, Peitsch M. Nicotine and Other Tobacco Compounds in Neurodegenerative and Psychiatric Diseases. London, Academic Press, 2018, str. 83-97.

Viegas D, Palmeira-de-Oliveira A, Salguiero L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151, 54-65.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi II. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017, str. 4.

Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17, 300-312.

Weglarz Z, Kosakowska O, Pióro-Jabrucka E, Przybył JL, Gniewosz M, Krasniewska K, Szyndel MS, Costa R, Baczek KB. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe. *Pharmaceuticals*, 2022, 15, 735.

Yong CW, Washington C, Smith W. Structural behaviour of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in water: molecular dynamics simulation studies. *Pharm Res*, 2008, 25, 1092-1099.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1 Sažetak

Smilje (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don) je izvor visokovrijednih polifenola, prirodnih antioksidansa. Raznolikost tih kemijskih spojeva koji pojedinačno ili u sinergiji pridonose farmakološkoj aktivnosti, nudi brojne mogućnosti praktične primjene ekstrakata biljke. U cilju učinkovitog izdvajanja navedenih spojeva iz biljnog materijala provedena je optimizacija ekstrakcijskih uvjeta. U radu je korištena metoda inkapsulacije (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrinom, te ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, u svrhu boljeg iskorištenja i skraćenog vremena ekstrakcije. U usporedbi sa konvencionalnom metodom ekstrakcije etanolom ili drugim organskim otapalima, ova metoda je ekološki prihvatljiva. Provedena je spektrofotometrijska analiza sadržaja ukupnih polifenola i podskupina polifenola, fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima, te kvantifikacija sadržaja klorogenske kiseline korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. HPLC). Najboljim uvjetima ekstrakcije pokazali su se neosporno: snaga ultrazvuka 720 W, temperatura 70 °C, masa droge 0,6 g te voda kao otapalo. Parametri s najvećim utjecajem na ekstrakcijski kapacitet su temperatura i masa droge. Snaga ultrazvuka indirektno utječe na prinos dok glicerol gotovo nema utjecaja. Udio mliječne kiseline pozitivno utječe na ekstrakciju fenolnih kiselina, pri nižim temperaturama, dok na koncentraciju flavonoida ima negativan utjecaj.

7.2 Summary

Immortelle (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don) is a source of high-value polyphenols, natural antioxidants. The diversity of these chemical compounds, which individually or synergistically contribute to pharmacological activity, offers many possibilities in practical use of plant extracts. In order to efficiently extract mentioned compounds from plant material, extraction conditions were optimised. In this paper, methods that were used were (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin encapsulation and ultrasound-assisted extraction for the purpose of better extraction efficiency and shortened extraction time. In comparison to conventional extraction method with ethanol or other organic solvents, this method is environmentally friendly. Spectrophotometric analysis of total polyphenols, phenolic subclasses, phenolic acids and flavonoids in the extracts was conducted, as well as

quantification of chlorogenic acid content using high performance liquid chromatography (HPLC). The best extraction conditions indisputably proved to be: ultrasound power 720 W, temperature 70 °C, drug weight 0,6 g and water as a solvent. Parameters with the greatest impact on the extraction capacity are temperature and drug mass. Ultrasound power affects the yield indirectly, while glycerol had almost no effect. The proportion of lactic acid has a positive effect on phenolic acids' extraction at lower temperatures, while it has a negative effect on the flavonoid concentration.

8. PRILOZI

Tablica P1. Koncentracije TP, TPA, TF i KK u ekstraktima.

Naziv ekstrakta	TP (mg/mL)	TF (mg/mL)	TPA (mg/mL)	KK (mg/mL)
E1	0,622	0,246	0,276	0,165
E2	0,766	0,220	0,532	0,419
E3	0,855	0,134	0,653	0,392
E4	0,661	0,286	0,262	0,149
E5	1,048	0,230	0,794	0,594
E6	0,877	0,191	0,603	0,381
E7	0,989	0,245	0,825	0,565
E8	1,430	0,328	1,013	0,795
E9	0,919	0,301	0,401	0,324
E10	0,852	0,354	0,363	0,314
E11	1,332	0,282	1,064	0,754
E12	2,057	0,463	1,557	0,816
E13	0,820	0,115	0,621	0,463
E14	0,502	0,042	0,310	0,248
E15	0,931	0,244	0,756	0,387
E16	1,744	0,345	1,226	0,684

TP = ukupni polifenoli, TPA = ukupne fenolne kiseline, TF = ukupni flavonoidi i KK = klorogenska kiselina.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ VRSTE HELICHRYSUM ITALICUM (ROTH) G. DON UPOTREBOM (2-HIDROKSIPROPIL)-B- CIKLODEKSTRINA

Dora Tomić

SAŽETAK

Smilje (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don) je izvor visokovrijednih polifenola, prirodnih antioksidansa. Raznolikost tih kemijskih spojeva, koji pojedinačno ili u sinergiji pridonose farmakološkoj aktivnosti, nudi brojne mogućnosti praktične primjene ekstrakata biljke. U cilju učinkovitog izdvajanja navedenih spojeva iz biljnog materijala provedena je optimizacija ekstrakcijskih uvjeta. U radu je korištena metoda inkapsulacije (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrinom, te ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, u svrhu boljeg iskorištenja i skraćenog vremena ekstrakcije. U usporedbi sa konvencionalnom metodom ekstrakcije etanolom ili drugim organskim otapalima, ova metoda je ekološki prihvatljiva. Provedena je spektrofotometrijska analiza sadržaja ukupnih polifenola i podskupina polifenola, fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima, te kvantifikacija sadržaja klorogenske kiseline korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. HPLC). Najboljim uvjetima ekstrakcije pokazali su se neosporno: snaga ultrazvuka 720 W, temperatura 70 °C, masa droge 0,6 g te voda kao otapalo. Parametri s najvećim utjecajem na ekstrakcijski kapacitet su temperatura i masa droge. Snaga ultrazvuka indirektno utječe na prinos dok glicerol gotovo nema utjecaja. Udio mliječne kiseline pozitivno utječe na ekstrakciju fenolnih kiselina pri nižim temperaturama, dok na koncentraciju flavonoida ima negativan utjecaj.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: smilje, (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, polifenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, klorogenska kiselina

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Jasna Jablan, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Marijan Marijan, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ULTRASONIC EXTRACTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM SPECIES *HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G.DON USING (2-HYDROXYPROPYL)- β - CYCLODEXTRINS

Dora Tomić

SUMMARY

Immortelle (*Helichrysum italicum*, (Roth), G. Don) is a source of high-value polyphenols, natural antioxidants. The diversity of these chemical compounds, which individually or synergistically contribute to pharmacological activity, offers many possibilities in practical use of plant extracts. In order to efficiently extract mentioned compounds from plant material, extraction conditions were optimised. In this paper, methods that were used were (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin encapsulation and ultrasound-assisted extraction for the purpose of better extraction efficiency and shortened extraction time. In comparison to conventional extraction method with ethanol or other organic solvents, this method is environmentally friendly. Spectrophotometric analysis of total polyphenols, phenolic subclasses, phenolic acids and flavonoids in the extracts was conducted, as well as quantification of chlorogenic acid content using high performance liquid chromatography (HPLC). The best extraction conditions indisputably proved to be: ultrasound power 720 W, temperature 70 °C, drug weight 0,6 g and water as a solvent. Parameters with the greatest impact on the extraction capacity are temperature and drug mass. Ultrasound power affects the yield indirectly, while glycerol had almost no effect. The proportion of lactic acid has a positive effect on phenolic acids' extraction at lower temperatures, while it has a negative effect on the flavonoid concentration.

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

Thesis includes: 35 pages, 12 figures, 2 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: immortelle, (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrins, ultrasound-assisted extraction, polyphenols, flavonoids, phenolic acids, chlorogenic acid

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijan Marijan, Ph.D. Postdoc, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2022.