

Ultrazvučna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz vrste *Plantago major* L.

Katavić, Matea

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:458391>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Katavić

**Ultrazvučna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz
vrste *Plantago major* L.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić i dr. sc. Marijanu Marijanu na pruženoj prilici i pomoći pri izradi ovog rada. Veliko hvala mojim roditeljima i prijateljima na potpori kroz sve godine studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Trputac (<i>Plantago major</i> L.)	1
1.2. Polifenoli	3
1.2.1. Fenolne kiseline.....	3
1.2.2. Flavonoidi.....	4
1.3. Verbaskozid.....	6
1.4. Ultrazvučna ekstrakcija	7
1.5. Ciklodekstrini	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Biljni materijal.....	11
3.1.2. Kemikalije	11
3.1.3. Uređaji.....	11
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija	11
3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola	13
3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida	14
3.2.4. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina	15
3.2.5. Određivanje polifenolnih sastavnica korištenjem HPLC-a	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Ukupni polifenoli	17
4.2. Ukupni flavonoidi	19
4.3. Ukupne fenolne kiseline.....	21
4.4. Verbaskozid.....	23
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA.....	26
7.1. Sažetak	31
7.2. Summary	32
8. PRILOZI.....	33

1. UVOD

1.1. Trputac (*Plantago major* L.)

Plantago major L. je višegodišnja biljka koja pripada porodici Plantaginaceae (Slika 1). Porodica Plantaginaceae obuhvaća 3 roda i oko 260 vrsta, te je široko rasprostranjena po cijelom svijetu. *P. major* naziva se veliki ili širokolisni trputac, te se često može pronaći u naseljenim mjestima (Jurišić Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004). Listovi trputca široki su 4-9 cm i dugi 5-20 cm, te su raspoređeni u rozete. Ovalnog su oblika s istaknutih 5-9 žila. Cvjetovi su sitni, tetramerni i smeđozelene boje. Na vrhu zeljaste bezlisne stabljike nalaze se cvjetovi skupljenih u klasasti cvat. Ljubičastih prašnika je četiri i jedan tučak. Oprašuje se vjetrom, a sjemenke su male, jajastog oblika i gorkog okusa (Nazarizadeh i sur., 2013).



Slika 1. *Plantago major* L. (<https://eunis.eea.europa.eu/species/177829>).

P. major sadrži različite bioaktivne supstance kao što su: flavonoidi, alkaloidi, terpenoidi, polisaharidi, iridoidi, vitamini, masne i fenolne kiseline. Najzastupljeniji flavonoidi su flavoni apigenin i luteolin. Od ugljikohidrata nalaze se ksiloza, arabinoza, galaktoza, galakturonska kiselina, glukoza, sluzi i dr. Neke od prisutnih masnih kiselina su: stearinska, linolna, linolenska i oleinska kiselina. Od fenolnih kiselina poznato je da sadrži: kavenu, siringičnu, vanilinsku, feruličnu, *p*-hidroksibenzojevu, *p*-kumarinsku, salicilnu,

benzojevu i cimetnu kiselinu. Predstavnici feniletanoidnih glikozida su verbaskozid i plantamajozid. Iridoidi, odnosno iridoidni glikozidi, koji se pretežito nalaze u *P. major* su aukubin, asperulozid i katapol. Prisutne triterpenske kiseline su oleanolna i ursolna kiselina. Osim toga, dobar je izvor vitamina C i karotenoida.

Diljem svijeta koristi se za liječenje različitih oboljenja. Pomaže u zacjeljivanju rana, snižava razinu glukoze i kolesterola u krvi, koristan je kod dijareje i djeluje protiv bakterijskih i virusnih infekcija. Dobar je antioksidans i učinkovito veže slobodne radikale, te se koristi za tretiranje različitih kroničnih poremećaja i bolesti (Adom i sur., 2017; Samuelsen, 2000). Također, uočeno je da ima protuupalno i diuretično djelovanje (Jurišić Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004).

Imunomodulatorno djelovanje ostvaruje se povećanim stvaranjem dušikova oksida (NO), faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) i stimulacijom proliferacije limfocita. Smanjivanje razine alanin aminotransferaza (ALT) i aspartat aminotransferaza (AST) ukazuje na njegovo hepatoprotektivno djelovanje. Visoki sadržaj sluzi u sjemenkama biljke pomaže kod gastroprotekcije. Može se koristiti kod alergije i astme jer inhibira degranulaciju mastocita. Inhibicijom sinteze prostaglandina djeluje analgetički i protuupalno. Pokazalo se da posjeduje citotoksično djelovanje, te se potencijalno može koristiti u prevenciji karcinogeneze.

Dnevna doza je 3-5 g biljke u prahu 1-3 puta dnevno, a u obliku infuza 150 ml 3-4 puta dnevno. *P. major* je sigurna biljka, a moguće nuspojave su: mučnina, povraćanje, proljev, anoreksija i nadutost (Najafian i sur., 2018).

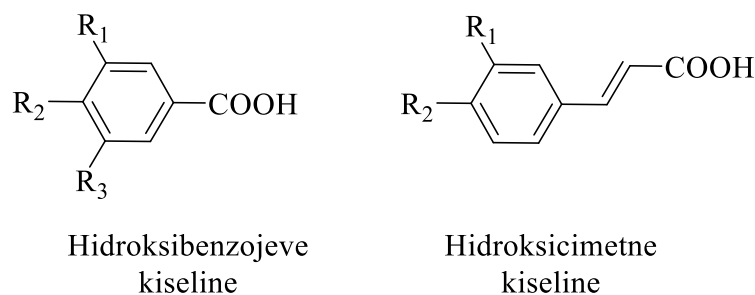
1.2. Polifenoli

Polifenoli su jedni od najraširenijih i najbrojnijih metabolita u biljnom svijetu. Zbog svog jakog antioksidativnog djelovanja privlače sve više pažnje. Karakteristike njihove strukture su da sadrže minimalno jedan aromatski prsten, te jednu ili više hidroksilnih skupina. Bogati izvori polifenola su voće, povrće, žitarice, ali i neka pića kao što su kava, čaj, pivo i vino. Izgled, boja, okus i miris biljaka svojstva su za koja su odgovorni polifenoli. Na primjer, pridonose gorčini voća i voćnih sokova. Imaju zaštitu ulogu u biljkama, te pomažu u obrani od patogena, parazita i UV zračenja (Dai i Mumper, 2010).

Trenutno je u biljnom materijalu identificirano više od 8000 spojeva fenolne strukture koji se, osim prema strukturi, razlikuju i na temelju njihova podrijetla i biološke funkcije. U polifenolne spojeve ubrajamo: fenolne kiseline, feniletanoidne glikozide, lignane, flavonoide, antocijane i trjeslovine. Veliki broj polifenola se u biljkama nalazi u obliku glikozida s različitim jedinicama šećera. Imaju važnu ulogu u ljudskom zdravlju i povezuju se sa smanjenjem rizika od nekih kroničnih bolesti, kao što su: rak, kardiovaskularne, različite upalne i neurodegenerativne bolest. Djeluju kao snažni antioksidansi i mogu inducirati antioksidativne enzime (glutation peroksidaza, katalaza i dr.), a inhibirati ekspresiju enzima kao što je ksantin oksidaza (Rong T, 2010). Također, uočeno je da polifenoli usporavaju razvoj ateromatoznih plakova inhibirajući oksidaciju lipoproteina niske gustoće, što se smatra ključnim mehanizmom kod javljanja ateroskleroze (D'Archivio i sur., 2007).

1.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline dijele se na temelje njihove osnovne strukture (Slika 2) na derivate benzojeve kiseline s C_6-C_1 jedinicom i derivati cimetine kiseline s C_6-C_3 jedinicom (Rong T, 2010). Količina derivata benzojeve kiseline u biljkama najčešće je niska, a primjer takvih kiselina su galna, vanilinska i siringična kiselina. One su komponente složenijih struktura, kao što su trjeslovine (galotanin u mangu, elagitanin u jagodama, malini i kupini). Među najraširenije derivate cimetine kiseline ubrajaju se: kumarinska, kavena, ferulična i sinapna kiselina. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku te su prisutne u obliku estera, amida ili glikozida.



Slika 2. Kemijske formule osnovnih struktura fenolnih kisljina.

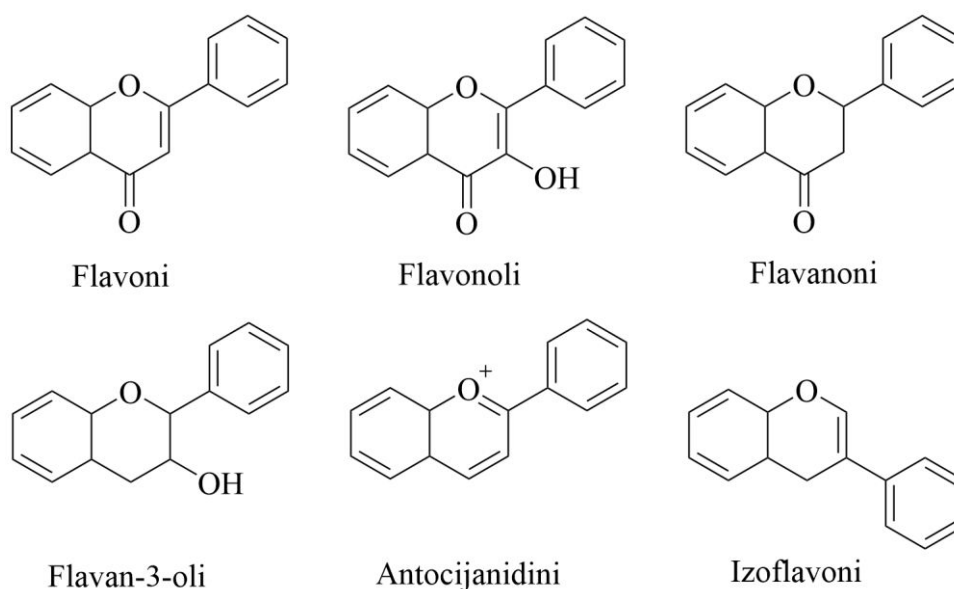
Kliniĉkim studijima je dokazano da kavena kisljina smanjuje trombocitopeniju i leukopeniju uzrokovanu imatinibom u pacijenata oboljelih od kroniĉne mijeloiĉne leukemije (Bival Štefan, 2015). Jedan od najraširenijih derivata kavene kisljine je klorogenska kisljina, prisutna u visokim koncentracijama u raznom voću (Manach i sur., 2004). Klorogenska kisljina poboljšava osjetljivost na inzulin, smanjuje sistoliĉki i dijastoliĉki tlak, pokazuje antiagregacijsko djelovanje i smanjuje stvaranje ugrušaka pa ima potencijalnu primjenu u lijeĉenju kardiovaskularnih oboljenja. Kumarinska kisljina ima potencijalnu primjenu u prevenciji simptoma anksioznosti, a feruliĉna kisljina je pokazala nefroprotektivno i neuroprotektivno djelovanje.

1.2.2. Flavonoidi

Struktura flavonoida sastoji se od dva benzenska prstena koji su povezani propanskim lancem. Središnji dio strukture najĉešće je spojen s kisikom u heterocikliĉki prsten. Razliĉite podskupine flavonoida nastale su zbog razlika u oksidacijskom stanju heterocikliĉkog prstena, a to su: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, antocijanidini i flavanoli (Slika 3).

Flavonole karakterizira prisutnost dvostruke veze izmeĉu C2 i C3, te hidroksilna skupina na poloŹaju C3. Najzastupljeniji su flavonoidi u hrani, a glavni predstavnici su kvercetin i kemferol. Bogati izvori flavonola su: luk, kelj, poriluk, brokula i borovnica. Nalaze se najviše u vanjskom i nadzemnom dijelu ploda jer je njihova sinteza stimulirana svjetlom. Flavoni su manje zastupljeni flavonoida, koji u svojoj strukturi imaju dvostruku vezu izmeĉu C2 i C3. Primjeri flavona su apigenin i luteolin, a njihov glavni izvor su peršin i

celer. Flavanoni imaju zasićeni lanac od tri ugljika, a neki od njih su hesperidin i naringenin. U visokim koncentracijama nalaze se u agrumima, ali također ih ima u rajčicama i aromatičnom bilju. Izoflavonoidi posjeduju hidroksilne skupine na položaju C4 i C7, što ih čini strukturno sličnim estrogenima. Spadaju u fitoestrogene jer se mogu vezati na estrogenske receptore. Glavni izvor izoflavonoida su mahunarke, a njihovi predstavnici su daidzein i genistein. Antocijanini su glikozidi koji se sastoje od aglikona antocijanidina i šećera (glukoza, galaktoza ili ramnoza). To su pigmenti koji uzrokuju crvenu, plavu i ljubičastu boju biljaka. Pretežno su prisutni u voću, ali ih ima i u korjenastom povrću, žitaricama i crnom vinu. Flavanoli se prisutni u obliku monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina). Njihovi glavni predstavnici u voću su katehin (marelice i trešnje) i epikatehin, a u čaju su to galokatehin i epigalokatehin (D'Archivio i sur., 2007).



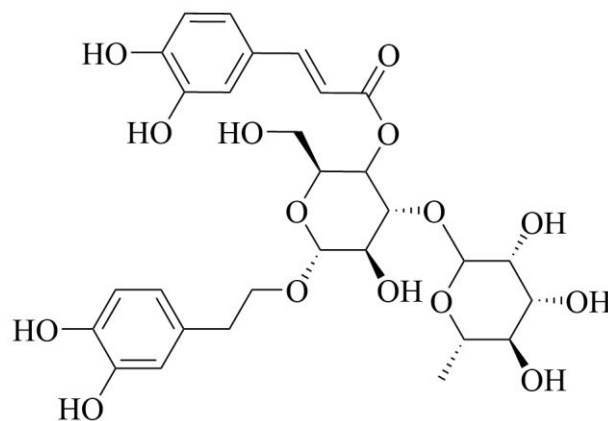
Slika 3. Podjela flavonoida prema strukturi.

Flavonoidi pokazuju širok raspon djelovanja poput: antimikrobnog, antivirusnog, antifungalnog, diuretičkog, antihipertenzivnog, antialergijskog, antiinflamatornog, kardioprotektivnog, antihepatoksičnog, antiulkusnog, analgetičkog i antioksidativnog djelovanja. Također, pokazuju sposobnost inhibicije nekih enzima (hijaluronidaze, ciklooksigenaze, fosfolipaze i dr.), a mogu i inducirati enzime (arilhidrolaza i epoksid-hidrolaza) (Jurišić Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004). Baikalein, hispidulin i plantaginin su neki od

flavonoida izoliranih iz *P. major*. Imaju antioksidativno djelovanje, učinkovito vežu slobodne radikale te inhibiraju peroksidaciju lipida. Baikalein pokazuje antialergijska svojstva, a u određenim koncentracijama djeluje citotoksično na tumorske stanice i inhibira rast ljudskih stanica hepatoma (Samuelsen, 2000).

1.3. Verbaskozid

Verbaskozid (akteozid) je feniletanoidni glikozid koji je prvi put izoliran 1963. godine iz *Verbascum sinuatum* L (Slika 4). Feniletanoidni glikozidi su prirodni spojevi čiju strukturu čine feniletil alkohol, kavena kiselina i glikozidne skupine (Tian i sur., 2020). Glikozidni dio većinom je esterificiran derivatima hidroksicimetne kiseline kao što su kumarinska, kavena i ferulična kiselina. Topljivi su u vodi, a izolirani su iz korijena, stabljike, kore, lišća, cvijeća, plodova i sjemenki ljekovitog bilja (Wu i sur., 2020). Verbaskozid je bijeli amorfni prah gorkog okusa (He i sur., 2011). Uglavnom je otkriven u vrstama roda *Verbascum*, ali nalazi se i u još 200 drugih biljnih vrsta kao što su *Buddleja brasiliensis*, *Striga asiatica* i *Olea europea* (Alipieva i sur., 2014). Najveća koncentracija verbaskozida u vrsti *P. major* određena je u cvjetnim stapkama i sjemenkama, a najniža u suhom lišću (Zubair i sur., 2011).



Slika 4. Kemijska struktura verbaskozida.

Verbaskozid pretežito djeluje na način da modulira transkripciju gena za različite enzime i regulatorne čimbenike. Na primjer, povećava transkripciju gena nekih antioksidativnih enzima aktivacijom Nrf2 (nuklearni faktor 2 sličan eritroidu) (Galli i sur., 2020). Tradicionalno, biljke s visokom koncentracijom verbaskozida koriste se za liječenje

upala i bakterijskih infekcija. Verbaskozid također pomaže pri zacjeljivanju rana, ima neuroprotektivno, protuupalno i antioksidativno djelovanje (Alipieva i sur., 2014).

1.4. Ultrazvučna ekstrakcija

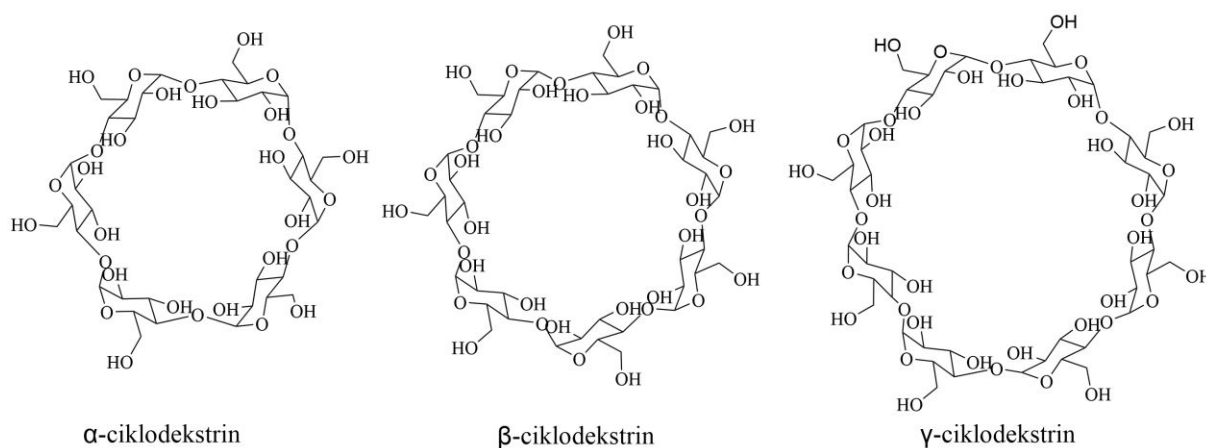
Ekstrakcija je kritični korak u fitokemijskoj analizi biljnog materijala jer omogućuje odvajanje aktivnih komponenti od prirodnog matriksa. Poželjno je da ekstrakcija minimalno utječe na stabilnost ekstrahiranih spojeva. Trenutno je dostupan širok raspon metoda za ekstrakciju bioaktivnih komponenti, a dijele se u dvije kategorije: tradicionalne i inovativne. Neke od tradicionalnih tehnika su tekućinsko-tekućinska ekstrakcija, perkolacija, maceracija, a od inovativnih mikrovalna ekstrakcija, superkritična fluidna ekstrakcija (SFE), ekstrakcija pomoću pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvučna ekstrakcija (UE) (Mosić i sur., 2020).

UE koristi ultrazvučne valove za stvaranje kavitacijskih mjehurića u ekstrakcijskom otapalu (Bodoira i Maestri, 2020). Prolaskom zvučnih valova kroz otapalo nastaju longitudinalni valovi, te dolazi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije tlaka (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kavitacijski mjehurići, kada dođu do nestabilne točke, implozijom oslobađaju visoku temperaturu i visoki tlak. Dolazi do pucanja stanične stijenke, oslobađanja metabolita i boljeg prodora otapala u biljni materijal (Lefebvre i sur., 2021).

Faktori koji utječu na UE su: snaga ultrazvuka, frekvencija, temperatura, dizajn reaktora, otapalo, omjer otapalo-uzorak te veličina i struktura čestica. Dakle, niža frekvencija i veća snaga ultrazvuka postižu jaču imploziju mjehurića i posljedično tome uspješniju ekstrakciju. Upotreba UE poboljšava učinkovitost i brzinu ekstrakcije, smanjuje potrebnu temperaturu za ekstrakciju, omogućuje uštedu otapala i pridonosi topljivosti ciljanih spojeva. Koristi se za ekstrakciju polifenola iz biljnog tkiva, proteina, šećera i škroba iz žitarica i mahunarki, arome od zelene metvice i lavande (Escalpez i sur., 2011).

1.5. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji sadrže šest (α -CD), sedam (β -CD) i osam (γ -CD) glukopiranoznih jedinica (Slika 5). Nastaju razgradnjom škroba djelovanjem enzima ciklodekstringlukoziltransferaze (CGT) kojeg proizvode *Bacillus macerans* i još neki mikroorganizmi. Molekule glukoze u strukturi CD se nalaze u konformaciji stolca s hidroksilnim skupinama orijentiranim prema vani. S druge strane, u centralnoj šupljini molekule prevladavaju ugljikov skelet i eterski atomi kisika (Brewster i Loftsson, 2007).



Slika 5. Kemijske strukture različitih ciklodekstrina.

Zbog hidrofilnih svojstava vanjskog dijela molekule, CD imaju relativno dobru topljivost u vodi, a zbog lipofilnosti šupljine mogu stvarati inkluzijske komplekse s hidrofobnim molekulama (Jug i Bećirević-Laćan, 2002). Inkluzijski kompleksi nastaju u vodenim otopinama gdje dolazi do zamjene molekule vode, smještene u centralnoj šupljini, s molekulom ili dijelom molekule lijeka (Brewster i Loftsson, 2007).

Najbitniji ciklodekstrini su α , β i γ , a njihova važna fizikalno-kemijska svojstva su: promjer i volumen centralne šupljine, topljivost u vodi i Gibbsova slobodna energija otapanja. β -CD ima promjer centralne šupljine optimalne veličine za većinu kemijskih spojeva, ali slabe je topljivosti u vodi (Di Cagno, 2017). Zbog jakog vezanja molekula CD u kristalnoj rešetci i stvaranja intramolekulskih vodikovih veza, prirodni CD su slabije topljivi u vodi od odgovarajućih linearnih ciklodekstrina. Supstitucijom hidroksilnih skupina, čak i s lipofilnom

skupinom (metilnom), dolazi do povećanja topljivosti CD. Na primjer, tretiranjem bazične otopine β -CD propilenoksidom nastaje (2-hidroksipropil- β)-CD kojeg karakterizira povećana topljivost u vodenom mediju. Također, derivatizacijom se mogu pripremiti i ostali CD derivati poput sulfobutileter- β -CD, metilirani- β -CD, te glukozil i maltozil- β -CD (Brewster i Loftsson, 2007).

Nastajanje inkluzijskih kompleksa povećava topljivost lijeka, osigurava fizičku i kemijsku stabilnost i utječe na druga fizikalno-kemijska svojstva. Također, CD su korišteni i za maskiranje okusa gorkih materijala, smanjivanje hlapljivosti lijekova i za kontrolirano oslobađanje lijeka (Stella i He, 2008). Primjeri lijekova koji se nalaze na tržištu s CD su: alprostadil s α -CD, omeprazol i piroksikam s β -CD, itrakonazol i indometacin s 2-hidroksipropil- β -CD, vorikonazol sa sulfobutileter- β -CD i mnogi drugi (Davis i Brewster, 2004).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Plantago major L. je cvjetnica iz porodice trputaca Plantaginaceae koja potječe iz većeg dijela Europe te sjeverne i središnje Azije, ali je široko naturalizirana diljem svijeta. Zbog svojih ljekovitih svojstava *P. major* koristi se diljem svijeta za liječenje raznih bolesti. Sadrži brojne biološki aktivne spojeve, a za većinu ljekovitih učinka odgovorni su polifenolni spojevi. Cilj ovog istraživanja bio je analiza ekstrakcijskih čimbenika (sadržaj glicerola, koncentracija 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina, temperatura, trajanje ekstrakcije, snaga ultrazvuka i sadržaj mliječne kiseline) kako bi se odredili oni koji utječu na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva (ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i verbaskozida). Navedeni rezultati bili bi primjenjivi u izradi ekstrakata koji bi ulazili u sastav ljekovitih i kozmetičkih proizvoda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

U ispitivanju korištena je biljna vrsta *Plantago major* L. ubrana u zagrebačkom naselju Lanište (45° 46' 8.3166", 15° 55' 56.4342"). Osušena i usitnjena biljka pohranjena je na suho i tamno mjesto.

3.1.2. Kemikalije

Korištene su sljedeće kemikalije: kvercetin dihidrat, kavena kiselina, (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mliječna kiselina (Merck, Darmstadt, Germany), glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) i verbaskozid (TCI, Tokio, Japan). Sva ostala otapala i reagensi bili su analitičke čistoće.

3.1.3. Uređaji

Korišteni su sljedeći uređaji: precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelja (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), UV/Vis čitač mikrotitarskih pločica (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany), tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti (engl. HPLC) Agilent 1200 opremljen s 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 od 50 mL izvagano je 0,50 g usitnjenog biljnog materijala. Neposredno prije početka ultrazvučne ekstrakcije (UE), 10 g ekstrakcijskog otapala dodano je u tikvicu s biljnim materijalom. Ekstrakcije su provedene u sljedećim uvjetima: udio glicerola (GL) 10-70%, udio mliječne kiseline (MK) 0-5%, množina (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrina 0-0,3 mmol (0-0,4188 g, HP- β -CD), vrijeme ekstrakcije (t) 10-30 min, temperatura (T) 20-70 °C i snaga ultrazvuka (engl. ultrasound power, USP) 20-100%. Odmah

nakon ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz naborani filter papir u vijale i pohranjeni na 4 °C. Uvjeti ekstrakcije i nazivi ekstrakta navedeni su u Tablici 1.

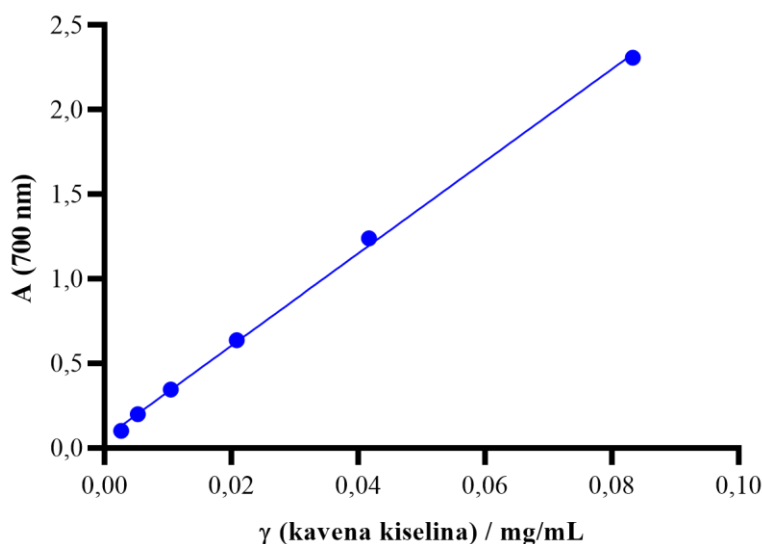
Tablica 1. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata.

Naziv ekstrakta	GL (%)	MK (%)	HP-β-CD (mmol)	t (min)	T (°C)	USP (W)
E1	10	5	0,3	10	70	720
E2	70	5	0,3	10	70	144
E3	70	5	0	10	70	720
E4	10	0	0	10	20	144
E5	70	0	0	30	20	144
E6	70	5	0	10	20	144
E7	10	0	0	10	70	720
E8	10	0	0,3	30	20	144
E9	10	0	0,3	10	20	720
E10	70	5	0,3	30	70	720
E11	70	0	0,3	10	20	144
E12	70	0	0	10	20	720
E13	10	5	0,3	30	20	720
E14	10	0	0,3	10	70	144
E15	10	0	0	30	70	144
E16	70	5	0	30	70	144
E17	70	5	0,3	10	20	720
E18	70	0	0,3	30	70	144
E19	10	5	0	30	70	720
E20	10	0	0	30	20	720
E21	10	5	0	30	20	144
E22	70	0	0,3	30	20	720
E23	10	5	0,3	30	70	144
E24	10	5	0	10	70	144
E25	70	0	0	30	70	720
E26	70	0	0,3	10	70	720
E27	70	0	0	10	70	144
E28	70	5	0	30	20	720
E29	70	5	0,3	30	20	144
E30	10	5	0,3	10	20	144
E31	10	0	0,3	30	70	720
E32	10	5	0	10	20	720

GL = glicerol, MK = mliječna kiselina, HP- β -CD = (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin, t = vrijeme ekstrakcije, T = temperatura i USP = snaga ultrazvuka.

3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (engl. Total phenolic content, TP) određen je na mikrotitarskoj pločici korištenjem modificirane Folin-Ciocalteu kolorimetrijske metode (Marijan i sur., 2022). Folin-Ciocalteu reagens razrijeđen je s vodom u omjeru 1:3. U jažicu na mikrotitarskoj pločici dodano je 80 μL otopine ekstrakta, 80 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 80 μL 10 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon sat vremena inkubacije u tamnoj komori izmjerena je apsorbancija na 700 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra. Iz baždarnog pravca kavene kiseline (0,50 mg/mL, Slika 6) određen je sadržaj ukupnih polifenola. Jednadžba pravca, $y = 28,08x - 0,01$ (x je masena koncentracija standarda, a y apsorbancija pri određenoj valnoj duljini), je imala visoki stupanj linearnosti ($r^2 = 0,9973$).

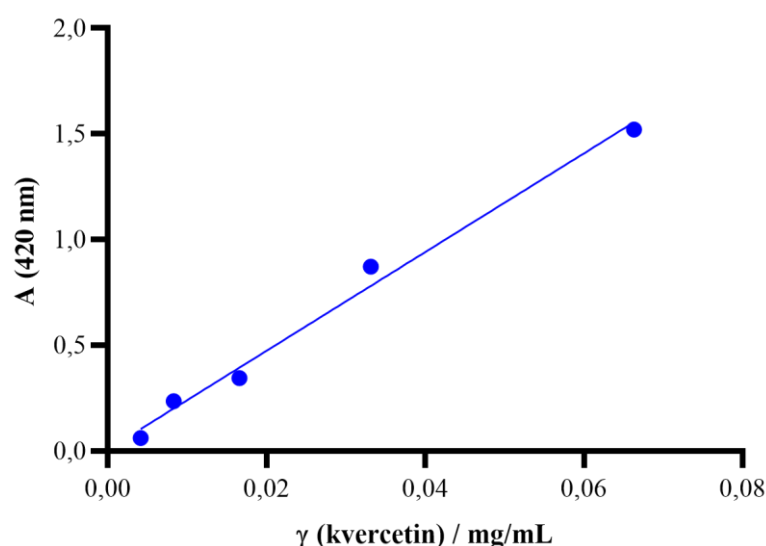


Slika 6. Baždarni pravac kavene kiseline za ukupne polifenole.

Radi lakše usporedbe literaturno dostupnih vrijednosti rezultati ovoga radu su također prikazani kao ekvivalenti galne kiseline (GK, 0,31 mg/mL) prema baždarnom pravcu $y = 56,15 - 0,01$ ($r^2 = 0,9981$). Rezultati su iskazani kao μg ekvivalenta kavene kiseline ili galne kiseline u mililitru ekstrakta ($\mu\text{g/mL}$). Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati izraženi kao aritmetička sredina.

3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida (engl. Total flavonoid content, TF) provedeno je korištenjem modificirane kolorimetrijske metode (Kumazawa i sur., 2004). U jažicu na mikrotitarskoj pločici dodano je 120 μL metanolne otopine ekstrakta i 120 μL 0,2 %-tne metanolne otopine AlCl_3 . Nakon sat vremena inkubacije u tamnoj komori izmjerena je apsorbancija na 420 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra.

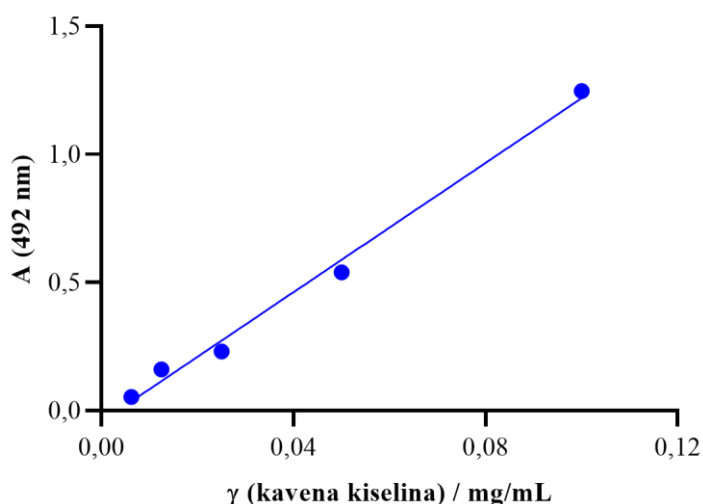


Slika 7. Baždarni pravac kvercetin hidrata za ukupne flavonoide.

Iz baždarnog pravca kvercetin dihidrata (0,30 mg/mL, Slika 7) određen je ukupni sadržaj flavonoida. Jednadžba pravca, $y = 23,55x - 0,01$ (x je masena koncentracija standarda, a y apsorbancija pri određenoj valnoj duljini), je imala visoki stupanj linearnosti ($r^2 = 0,9908$). Rezultati su prikazani kao μg ekvivalenta kvercetin dihidrata u mililitru ekstrakta ($\mu\text{g/mL}$). Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati izraženi kao aritmetička sredina.

3.2.4. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje ukupnih fenolnih kiselina (engl. Total phenolic acid content, TFA) provedeno je korištenjem spektrofotometrijske metode s nitrit-molibdatom (Nicolle i sur., 2004). U jažicu na mikrotitarskoj pločici dodano 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 10 minuta, a nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija na 492 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra.



Slika 8. Baždarni pravac kavene kiseline za ukupne fenolne kiseline.

Iz baždarnog pravca kavene kiseline (0,57 mg/mL, Slika 8) određen je sadržaj ukupnih fenolnih kiselina. Jednadžba pravca, $y = 12,25x - 0,02$ (x je masena koncentracija standarda a y apsorbancija pri određenoj valnoj duljini), je imala visoki stupanj linearnosti ($r^2 = 0,9920$). Rezultati su prikazani kao μg ekvivalenta kavene kiseline u mililitru ekstrakata ($\mu\text{g/mL}$). Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati izraženi kao aritmetička sredina.

3.2.5. Određivanje polifenolnih sastavnica korištenjem HPLC-a

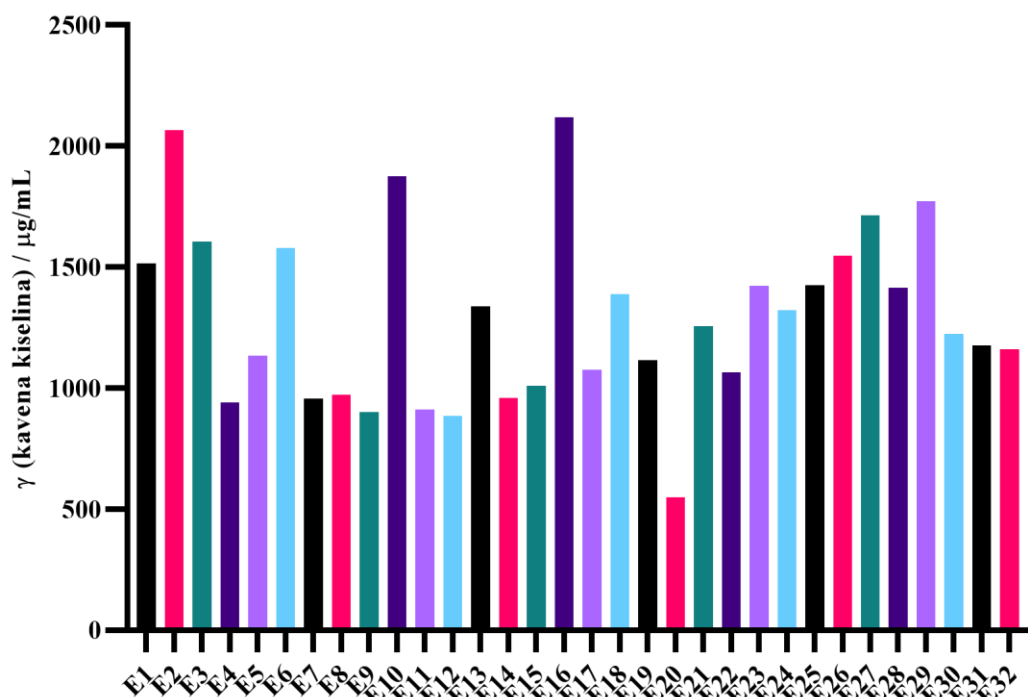
Svi ekstrakti i standardi (0,2 mg/mL) filtrirani su prije primjene kroz 0,45 µm PTFE filtere za šprice (CHROMAFIL Xtra PTFE, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) te je korištena modificirana literaturno opisana metoda (Yang i sur., 2020). Acetonitril je korišten kao otapalo A, a voda kao otapalo B te su primijenjeni prema sljedećem protokolu: 0–2 min, 2–3 % A; 2–3 min, 3–3,5 % A; 3–13 min, 3,5–5 % A; 13–18 min, 5–16 % A; 18–27 min, 16–35 % A; 27–29 min 35–2 % A; i 29–30 min 2 % A. Odvajanje je postignuto pri 30 °C i protoku od 1,0 mL/min. Sadržaj verbaskozida (Ver) određen je na 204 nm. Iz prije konstruiranog baždarnog pravca određene su polifenolne sastavnice. Jednadžba pravca je $y = 1687,24x - 410,43$ (y = površina ispod krivulje u kromatogramu, x = masa standarda u µg,) i ima visoki stupanj linearnosti ($r^2 = 1,0000$). Rezultati su prikazani kao mikrogrami po mililitru ekstrakta (µg/mL). Identifikacija se provodi uspoređivanjem vremena retencije i UV spektara u kromatogramu uzoraka sa standardima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ukupni polifenoli

Biljni ekstrakti bogati polifenolnim komponentama važni su zbog antioksidativnog učinka navedenih spojeva. Zahvaljujući antioksidativnom učinku i sposobnosti apsorbiranja UV zračenja, preparati bogati polifenolima koriste u cijelom nizu medicinskih proizvoda. Osim kao aktivne komponente, mogu se koristiti i kao pomoćne sastavnice gotovih oblika jer sprječavaju oksidaciju lijeka i pomoćnih tvari čime produžuju trajanje lijeka (de Lima Cherubim i sur., 2020).

Sadržaj ukupnih polifenola određen je prije opisanom spektrofotometrijskom metodom te su rezultati uspoređeni međusobno (Slika 9, Tablica P1) u svrhu određivanja najboljih ekstrakcijskih uvjeta. Također, rezultati su izraženi kao ekvivalenti kavene i galne kiseline kako bi se mogli usporediti s literaturno dostupnim izvorima (Tablica P1).



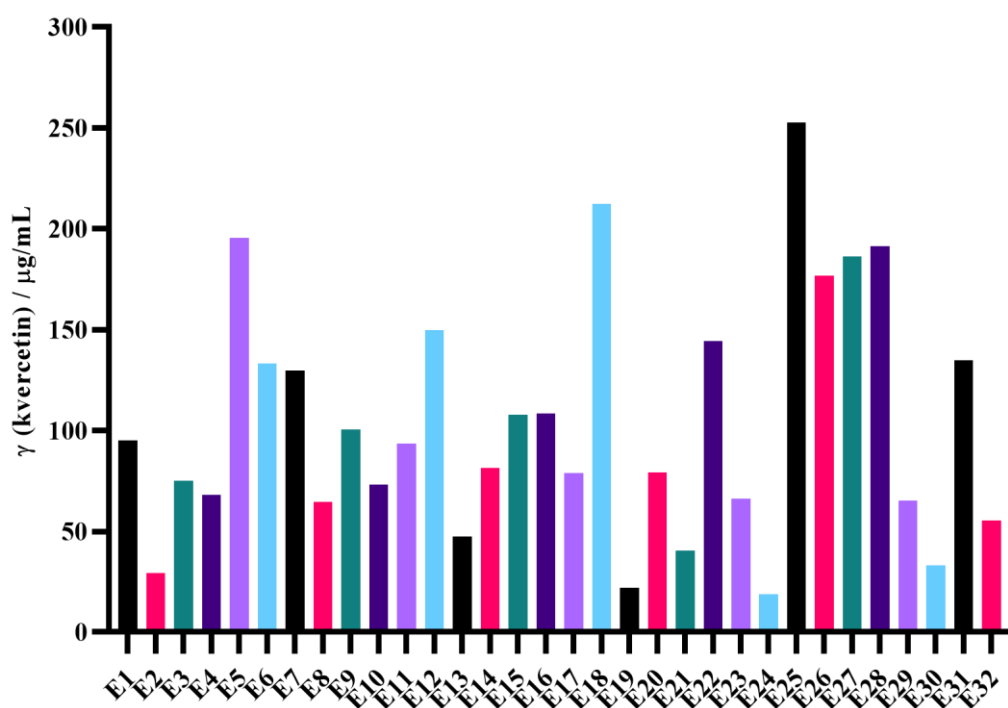
Slika 9. Usporedba koncentracija ukupnih polifenola u ekstraktima E1-E32. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

Vrijednost ukupnih polifenola se kretala od 550,43 $\mu\text{g KK/mL}$ do 2118,40 $\mu\text{g KK/mL}$, odnosno od 275,215 $\mu\text{g GK/mL}$ do 1059,2 $\mu\text{g GK/mL}$. Ekstrakti s najvećom koncentracijom ukupnih polifenola bili su E16 i E2, a s najmanjom E20 i E12. Zajedničke karakteristike ekstrakta E16 i E2 su da sadrže 70 % glicerola (GL) i 5 % mliječne kiseline (MK), a ekstrahirani su pri temperaturi od 70 °C i snazi ultrazvuka od 144 W. Ekstrakti E20 i E12 ne sadrže MK, a ekstrakcija je provedena pri temperaturi od 20 °C s ultrazvukom jačine 720 W. 10% GL se nalazi u ekstraktu E20, a 70% GL u E12. Glicerol povećava učinkovitost ekstrakcije polifenola zbog svoje polarnosti i niže dielektrične konstante (Shehata i sur., 2015). No, na temperaturi od 20°C GL ima visoku gustoću (1260 kg/m³), što može usporiti ekstrakciju tvari iz biljnog materijala i dovesti do određenih tehnoloških problema, npr. tijekom filtracije i sličnih procesa (Kowalska i sur., 2021). Povećanje temperature iznad 50 °C znatno smanjuje viskoznost GL (Wolfson i sur., 2007). Ukupni polifenoli su se bolje ekstrahirali u kiselijem mediju, odnosno uz 5% MK. Veća temperatura tijekom UE povećava topljivost analita, olakšava njegovu difuziju iz matrice uzorak i olakšava prodiranje otapala u uzorak. Učinak temperature je vidljiv kod ekstrakata E2 i E6, gdje je nižu koncentraciju ukupnih polifenola imao ekstrakt E6 ekstrahiran na temperaturi od 20 °C. Snaga ultrazvuka utječe na količinu ekstrahiranih tvari, ali također i na udio pojedinih ekstrahiranih vrsta (Escalpez i sur., 2011). Veća količina ukupnih polifenola je određena na nižoj snazi ultrazvuka.

U istraživanju iz 2008, gdje je korištena ultrazvučna ekstrakcija sa 70% etanolom, određena je koncentracija ukupnih polifenola u iznosu od 58700 $\mu\text{g GK/g}$ suhog ekstrakta (Stanisavljević i sur., 2008). U drugom istraživanju korištenjem tehnike macercije etanolom određen je sadržaj ukupnih polifenola u listu (13050 $\mu\text{g GK/g}$) i plodu (7430 $\mu\text{g GK/g}$) (Mohamed i sur., 2011). Tako visoki sadržaj u odnosu na istraživanja prikazana u okviru ovog diplomskog rada je i očekivan budući su Stanisavljević i sur. (2011) određivali sadržaj polifenola u suhim ekstraktima. Razlike u koncentraciji ukupnih polifenola mogu nastati zbog upotrebe različitog otapala i tehnike ekstrakcije. Upotrebom UE može doći do razgradnje i oksidacije fenolnih spojeva uslijed interakcije s visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima nastalim tijekom ultrazvučne obrade otopine (Stanisavljević i sur., 2008). Metoda s FC reagensom nije specifična samo za polifenolne spojeve, pa i drugi spojevi mogu promijeniti oksidacijski broj reagensa i tako utjecati na rezultate istraživanja

4.2. Ukupni flavonoidi

Biljni ekstrakti s visokim sadržajem flavonoida koriste se u cijelom nizu proizvodnih procesa s posebnim naglaskom na primjenu u kozmetičkoj i srodnim industrijama (Arct i Pytkowska, 2008). Sadržaj ukupnih flavonoida određen je literaturno dostupnom spektrofotometrijskom metodom, a rezultati su uspoređeni međusobno (Slika 10, Tablica P1) u svrhu određivanja najboljih ekstrakcijskih uvjeta te s literaturno dostupnim podacima.



Slika10. Usporedba koncentracija flavonoida u ekstraktima E1-E32. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

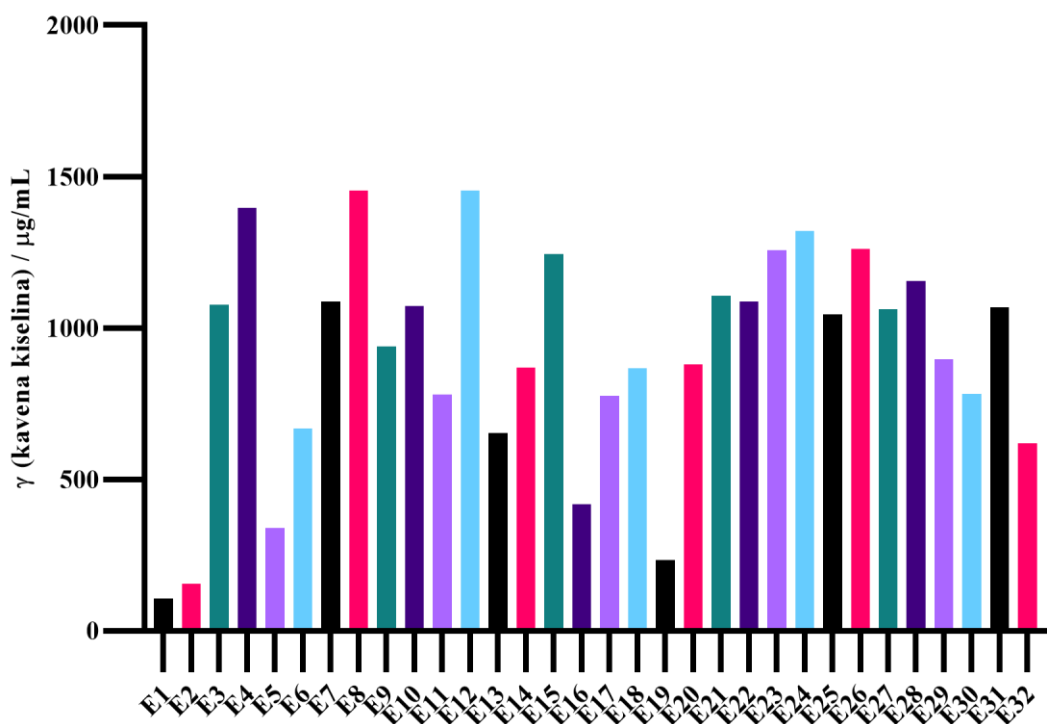
Koncentracija flavonoida u ekstraktima se kretala od 18,23 μg/mL do 252,81 μg/mL. Zajedničke karakteristike ekstrakata s najvećom koncentracijom flavonoida (E25 i E18) su da sadrže 70 % GL- i da je ekstrakcija trajala 30 min pri temperaturi od 70 °C. Ekstrakti s najmanjom koncentracijom flavonoida (E24 i E19) su sadržavali 10 % GL, 5% MK i ekstrahirani su na 70 °C. Moguće je da je došlo do razgradnje flavonoida pri visokoj temperaturi i prisutnosti MK. Razlika u uvjetima kod ekstrakta E25 i E18 je da je ekstrakt s

većom koncentracijom flavonoida (E25) bio izložen većoj snazi ultrazvuka (720 W) od ekstrakta E18 (144 W). Ekstrakti E14 i E15 su ekstrahirani u istim uvjetima, a razlikuju se u trajanju ekstrakcije. Ekstrakt s većom koncentracijom flavonoida (E15) se ekstrahirao 30 min, a onaj s manjom (E14) 10 min. Također, ekstrakti E5 i E6 se razlikuju u trajanju ekstrakcije i prisutnosti MK. Ekstrakt s nižom koncentracijom flavonoida (E6) sadržavao je 5 % MK i kraće se ekstrahirao (10 min). Još jedan primjer utjecaja MK na koncentraciju flavonoida je kod ekstrakta E12 i E17, gdje ekstrakt E17 sadrži 5 % MK i time mu je ukupna koncentracija flavonoida skoro dvostruko manja od E12 (GK, t, T i W su im isti).

Za ekstrakciju flavonoida i drugih polifenolnih spojeva najčešće se koriste polarna otapala kao što su: etanol, metanol, aceton i etil-acetat. Dokazano je da je metanol učinkovito otapalo kod ekstrakcije polifenola niže molekularne mase, dok je otopina acetona učinkovita kod ekstrakcije flavanola veće molekularne mase (Do i sur., 2013). U istraživanju u kojem je korištena metoda maceracije metanolom, ukupna količina flavonoida u *P. major* je iznosila 15760 µg QE/g (Kolak i sur., 2011). U drugom istraživanju koristila se isto tehnika maceracije, ali s etanolom i koncentracija flavonoida u listu *P. major* iznosila je 6410 µg QE/g, a u plodu 3030 µg QE/g (Mohamed i sur., 2011). Provedeno je istraživanje tehnikom maceracije 80 % metanolom u kojem je određen ukupni sadržaj flavonoida (5310 µg QE/g), ali i određenih flavonoidnih sastavnica kao što su luteolin-7-O-glukozid (213,58 µg QE/g), apigenin-7-O-glukozid (7,66 µg QE/g) i rutin (0,8 µg QE/g) (Beara i sur., 2009). Razlike u ukupnom sadržaju flavonoida dobivene u ovom radu i onih iz literaturnih izvora uglavnom potječu od toga što su ostali autori izražavali rezultat u odnosu na suhu tvar u ekstraktima, dok to u ovom istraživanju nije bilo moguće zbog nehlapljivosti glicerola. Dio razlika se može objasniti uporabom različitih otapala. Povećanjem polarnosti korištenog otapala povećava se prinos ekstrakcije. Stoga ne bi bilo iznenađujuće da ekstrakti priređeni pomoću metanola, otapala polarnijeg od etanola i glicerola, imaju veći ukupni sadržaj flavonoida. No za donošenje konačnih zaključaka bilo bi potrebno provesti ekstrakciju na način da su jednaki svi ekstrakcijski uvjeti osim vrste otapala

4.3. Ukupne fenolne kiseline

Fenolne kiseline sintetiziraju biljke kao odgovor na oksidacijski stres, u svrhu zaštite od negativnih vanjskih učinaka različitih insekata i mikroorganizama. Zahvaljujući izrazitom antioksidativnom učinku, koji se temelji na uklanjanju slobodnih radikala i keliranju metalnih iona koji potiču nastanak slobodnih radikala, sastavnice su brojnih medicinskih i kozmetičkih proizvoda. Rezultati sadržaja ukupnih fenolnih kiselina i njihova međusobna usporedba su prikazani na Slici 11 dok se brojčane vrijednosti za svaki navedeni ekstrakt nalaze u Tablici P1.



Slika 11. Usporedba koncentracija ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima E1-E32.

Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

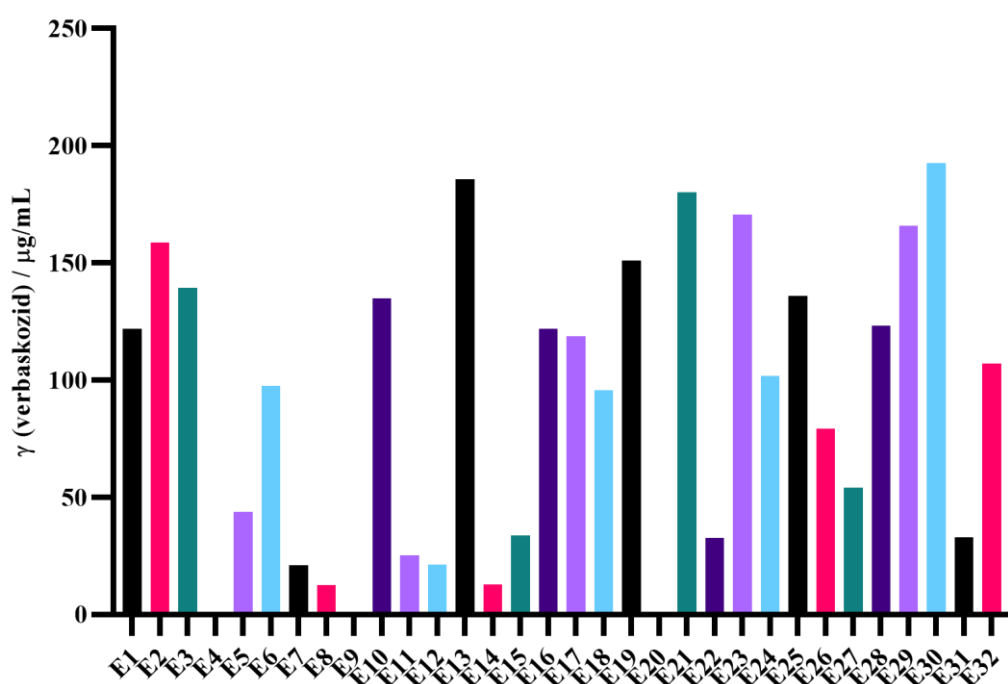
Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima kretala se u vrijednostima od 106,31 μg/mL do 1453,94 μg/mL. Ekstrakti s najvećom količinom ukupnih fenolnih kiselina su E8 i E12, a zajedničke karakteristike su im da je ekstrakcija provedena pri temperaturi od

20 °C bez prisutnosti MK. Najmanju koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina imaju ekstrakti E1 i E2, a zajedničko im je da sadrže 5% MK, 0,3 mmol HP- β -CD, te im je ekstrakcija trajala 10 min na 70 °C. Usporedbom ekstrakta E1 i E7 uočeno je da je došlo do skoro deseterostrukog povećanja koncentracije ukupnih fenolnih kiselina kada je ekstrakcija provedena bez prisutnosti MK. Isti uvjeti ekstrakcije (30 min, 20 °C i 144 W) su provedeni kod ispitivanja E5 i E8, te je ekstrakt koji je sadrži 10 % GL (E8) imao puno veću koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina od ekstrakta sa 70 % GL-om (E5). Kod ekstrakcije gdje je korištena veća temperatura (70 °C) i snaga ultrazvuka (720 W) dobiveni su obrnuti rezultati, te je veću koncentraciju imao ekstrakt sa 70 % -GL (E10) od ekstrakta s 10 %-GL (E19). To se može prepisati, već spomenutom, snižavanju viskoznosti GL zbog povećanja temperature (Wolfson i sur., 2007).

U istraživanju u kojem je korištena tehnika maceracije etanolom određena je količina pojedinih fenolnih kiselina u listu *P. major.*, a rezultati su sljedeći: 48,096 $\mu\text{g/g}$ galne kiseline, 81,64 $\mu\text{g/g}$ kavene kiseline, 24,78 $\mu\text{g/g}$ vanilinske kiseline, 41,58 $\mu\text{g/g}$ siringične kiseline, 1321,10 $\mu\text{g/g}$ elagne kiseline, 23,47 $\mu\text{g/g}$ kumarinske kiseline i 324,39 $\mu\text{g/g}$ ferulične kiseline (Mohamed i sur., 2011). Glavna razlika između količine fenolnih kiselina određenih u ovom istraživanju i istraživanju koje su proveli Mohamed i sur. (2011) je u tome što se u potonjem istraživanju količina ispitivanih sastavnica izražavala u odnosu na suhu tvar u ekstraktu. Količina fenolnih kiselina u biljkama ovisi o raznim čimbenicima kao što su: klimatski uvjeti, uzgoj, gnojidba, vrijeme žetve, skladištenje biljnog materijala i način pripreme (Arceusz i sur., 2013). Također, pokazalo se da tijekom UE ultrazvučni valovi mogu uzrokovati razgradnju nekih fenolnih kiselina (Al Jitan i sur., 2018). Posljedično, moguće je da dio razlike u ukupnoj količini fenolnih kiselina potječe od različitih otapala kojima je ekstrakcija provedena.

4.4. Verbaskozid

Verbaskozid se koristi za liječenje nekih kožnih oboljenja: aktinične keratoze, seboreične keratoze, pruritusa, psorijaze i kontaktnog dermatitisa. Koristi se za kod smanjenog integriteta dermisa i štiti od agresivnih čimbenika iz okoliša kao što su temperatura, zagađenje i UV zračenje (Robin, 2004). Sadržaj verbaskozida u uzorcima određen 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 verbaskozida u ekstraktima E1-E32. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u Tablici 1.

Koncentracija verbaskozida u uzorcima se kretala od 0 do 192,60 $\mu\text{g/mL}$. Najveću koncentraciju verbaskozida su imali ekstrakti E30 i E13, a njihova zajednička obilježja su da sadrže 10% GL, 5% MK, 0,3 mmol HP- β -CD i da je ekstrakcija provedena pri temperaturi od 20 °C. Ekstrakti u kojima nije detektiran verbaskozid ili je njegova koncentracija bila premala za detekciju su E4, E9 i E20. Zajedničko im je da su sadržavali 10 % GL, da nemaju MK te da je ekstrakcija provedena pri temperaturi od 20 °C. Usporedbom ekstrakta E1 i E7, koji se

razlikuju u prisutnosti MK, vidljivo je da je ekstrakt s 5% MK ima puno veću koncentraciju verbaskozida (E1). Dakle, verbaskozid ima najveću stabilnost u prisutnosti slabe kiseline kao što je MK (Vertuani i sur., 2011). Utjecaj temperature na koncentraciju verbaskozida vidljiv je na ekstraktima E2 i E6 te E5 i E18, gdje dolazi do povećanja koncentracije verbaskozida uslijed povećanja temperature s 20 °C na 70 °C. Osim razlike u temperaturi, ekstrakti E2 i E18 sadrže HP- β -CD, što također može dovesti do veće koncentracije verbaskozida. Uočeno je da fenolni spojevi tvore inkluzijske komplekse s HP- β -CD i time povećavaju svoju topljivost, ali i kemijsku stabilnost tijekom procesa ekstrakcije (Albahari i sur., 2018).

U istraživanju iz 2011. otkrivena su 3 glavna fenolna spoja u *P. major*, a to su plantamajozid, verbaskozid i do sada neidentificirani spoj. Pokazalo se da različiti udjeli etanola značajno utječu na prinos ekstrakcije zbog promjene ukupne polarnosti medija. Kao optimalno otapalo za ekstrakciju verbaskozida korištenjem ultrazvučne kupelji pokazao se 50 % etanol (Pei i sur., 2019). Sadržaj verbaskozida je bio najveći u cvjetnim stapkama i iznosio je 2300 μ g/g. Rezultati su izraženi kao mikrogrami po gramu osušenog biljnog tkiva (Zubair i sur., 2011).

5. ZAKLJUČAK

Korištenjem ultrazvučne ekstrakcije i mijenjanjem uvjeta pripreme dobiveni su ekstrakti E1-E32. Ukupni sadržaj polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina određen je spektrofotometrijskim metodama, dok je sadržaj verbaskozida određen upotrebom HPLC-a. Iz dobivenih koncentracija fenolnih spojeva može se odrediti koji su optimalni uvjeti za ekstrakciju pojedinih polifenola. Parametri koji su najviše utjecali na ekstrakciju su udio GL i MK, te temperatura, a vrijeme ekstrakcije i snaga ultrazvuka su imali nešto manji utjecaj. Korištenje HP- β -CD ima pozitivan utjecaj kod ekstrakcije verbaskozida. Polifenoli se lako otapaju u polarnim otapalima, a različite frakcije se mogu dobiti mijenjanjem polariteta ekstrakcijskog otapala. Povećani udio GL poboljšao je ekstrakciju većine polifenolnih spojeva, osim verbaskozida. Ukupni polifenoli i verbaskozid su se najbolje ekstrahirali u kiselom mediju, odnosno uz prisutnost 5% MK. Povećanje temperature i vremena ekstrakcije u većini slučajeva je poboljšalo učinkovitost ekstrakcije.

6. LITERATURA

Adode BM, Tahera M, Mutalabisina FM, Amria SM, Abdul Kudosa MB, Wan Sulaimanb MWA, Senguptaa P, Susanti D. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96, 348-360.

Al Jitan S, Alkhoori SA, Yousef LF. Chapter 13 - Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, urednik, Elsevier, 2018, str. 389-417.

Albahari P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brnčić M, Rimac Brnčić S, Vitali Čepo D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction, *LWT-Food Sci Technol*, 2018, 92, 22-31.

Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv*, 2014, 32, 1065-1076.

Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants: A Review. *Nat Prod Commun*, 2013, 8, 1821-1829.

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

Beara IN, Lesjak MM, Jovin E, Balog KJ, Anackov GT, Orčić DZ, Mimica-Dukic NM. Plantain (*Plantago* L.) Species as Novel Sources of Flavonoid Antioxidants. *J Agric Food Chem*, 2009, 57, 9268-9273.

Bival Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice *Lamiaceae*. Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015, 23-26.

Bodoira R, Maestri D. Phenolic Compounds from Nuts: Extraction, Chemical Profiles, and Bioactivity. *J Agric Food Chem*, 2020, 68, 927-942.

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

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and the antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 2007, 43, 348–361.

Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 12, 1023–1035.

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.

Di Cagno MP. The potential of cyclodextrins as novel active pharmaceutical ingredients: A short overview. *Molecules*, 2017, 22, 1-14.

Do DQ, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal*, 2013, 22, 296-302.

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

Escalpez MD, García-Perez JV, Mulet A, Cárcel JA. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng Rev*, 2011, 3, 108-120.

Galli A, Marciani P, Marku A, Ghislanzoni S, Bertuzzi F, Rossi R, Giancamillo AD, Castagna M, Perego C. Verbascoside Protects Pancreatic β -Cells against ER-Stress. *Biomedicines*, 2020, 8, 582.

He J, Xu XP, Zenx Y, Li Y, Wu HQ, Qui RZ, Ma W, Li T, Li CH, He ZD. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 449-464.

Jug M, Bećirević-Laćan M. Ciklodekstrini - nosači lijekova. *Farm Glas*, 2002, 58, 189-204.

Jurišić Grubešić R, Vladimir-Knežević S. Biološki aktivne tvari vrsta roda *Plantago* L. *Farm Glas*, 2004, 60, 79-89.

Jurišić Grubešić R, Vladimir-Knežević S. Morfološko-anatomska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L. *Farm Glas*, 2004, 60, 191-203.

Kolak U, Boga M, Akalin Ursak E, Ulubeleni A. Constituents of *Plantago major* subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities. *Turk J. Chem*, 2011, 35, 637-645.

Kowalska G, Baj T, Kowalski R, Szymańska J. Optimization of Glycerol–Water Extraction of Selected Bioactive Compounds from Peppermint and Common Nettle. *Antioxidants*, 2021, 10, 817.

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

Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A Review. *J. Chromatogr A*, 2021, 1635.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime'nez 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.

Mohamed IK, Osama MAF, Samiha MAEL, Mohamed ZEOM. Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *Int J Biodivers Conserv*, 2011, 3, 83-91.

Mosić M, Dramićanin A, Ristivojević P, Milojković-Opsenica D. Extraction as a Critical Step in Phytochemical Analysis. *J AOAC Int*, 2020, 103, 365-372.

Najafian Y, Hamed SS, Farshchi MK, Feyzabadi Z. *Plantago major* in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electron Physician*, 2018, 10, 6390-6399.

Nazarizadeh A, Mikaili P, Moloudizargari M, Aghajanshakeri S, Javaherypour S. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of *Plantago major* L. and its Active Constituents. *J Basic Appl Sci Res*, 2013, 3, 212-221.

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

Pei W, Guo R, Zhang J, Li X. Extraction of Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa* by High-Speed Shearing Homogenization Extraction,. *J AOAC Int*, 2019, 102, 63–68.

Robin JR i Rolland Y. 2004. World Patent WO2004069218A1J.

Rong T. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2010, 2, 1231-1246.

Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71, 1-21.

Shehata E, Grigorakis S, Loupassaki S, Makris DP. Extraction optimisation using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two *Artemisia* species. *Sep Purif Technol*, 2015, 149, 462-469.

Stanisavljević IT, Stojičević SS, Veličković DT, Lazić ML, Veljković. Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Extracts from Plantain (*Plantago Major* L.) Leaves. *Sep Purif Technol*, 2008, 14, 3652-3662.

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol*, 2008, 36, 30-42.

Tian XY, Li MX, Lin T, Qiu Y, Zhu YT, Li XL, Tao WD, Wand P, Ren XX, Chen LP. A review on the Structure and Pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *Eur J Med Chem*, 2020, 1-166.

Vertuani S, Beghelli E, Scalambra E, Malisardi G, Copetti S, Dal Toso R, Baldisserotto A, Manfredini S. Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. *Molecules*. 2011, 16, 7068–7080.

Wolfson A, Dlugy C, Shotland Y. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ Chem Lett*, 2007, 5, 67-71.

Wu L, Georgiev MI, Cao H, Nahar L, El-Seedi HR, Sarker SD, Xiao J, Lu B. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med Res Rev*, 2020, 40, 2605–2649.

Yang H, Hao Q, Cheng J, Wang M, Zoul J, Zhang X, Guo D. Exploring the compatibility mechanism of ShengDiHuang Decoction based on the in situ single-pass intestinal perfusion model. *Biopharm Drug Dispos*, 2020, 41, 44-53.

Zubair M, Nyboma H, Lindholmb C, Rumpunena K. Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Sci Hortic*, 2011, 128, 523–529.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Veliki ili širokolisni trputac (*Plantago major* L., Plantaginaceae) je široko rasprostranjena biljka, koja je poznata u narodnoj medicini već dugi niz godina. Sadrži brojne biološki aktivne spojeve, a to su: flavonoidi, alkaloidi, terpenoidi, iridoidi, vitamini, polisaharidi, masne i fenolne kiseline. Zahvaljujući svom kemijskom sastavu posjedu brojne biološke učinke. Primjerice, pomaže u zacjeljivanju rana, koristan je kod dijareje, pomaže u prevenciji virusnih i bakterijskih infekcije, te snižava razinu glukoze i kolesterola u krvi. Polifenoli djeluju protuupalno, antioksidacijski, te smanjuju rizik od nekih kroničnih bolesti, npr. kardiovaskularnih. U ovom radu je za ekstrakciju polifenola iz *P.major* korištena brza i učinkovita metoda ekstrakcije, ultrazvučna ekstrakcija. Spektrofotometrijski je određena količina ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina. Koncentracija verbaskozida određena je korištenjem HPLC-a. Usporedbom koncentracija spojeva i uvjeta pripreme ekstrakta ustanovilo se koji su parametri uvjetovali najefikasniju ekstrakciju pojedinih polifenola. Najveći sadržaj ukupnih polifenola imao je ekstrakt koji sadrži 70 % GL, 5 % mliječne kiseline, a ekstrahirao se 30 min pri temperaturi od 70°C i snazi ultrazvuka od 144 W. Flavonoidi su se najbolje ekstrahirali sa 70 % GL, bez mliječne kiseline, a ekstrakcija je trajala 30 min pri 70 °C i snazi ultrazvuka od 720 W. Fenolnim kiselina je odgovarao medij s 10 % GL i 0,3 mmol HP-β-CD, a ekstrakcija je trajala 30 min pri 20 °C i snazi ultrazvuka od 144 W. Ekstrakcija verbaskozida je najučinkovitije provedena s 10 % GL, 5% mliječne kiseline i 0,3 mmol HP-β-CD, a ekstrakcijsko vrijeme je bilo 10 min na 20 °C i pri snazi ultrazvuka od 144 W. Potrebno je statistički obraditi rezultate kako bi se preciznije odredilo koliko pojedini parametri utječu na ekstrakciju svih navedenih polifenolnih sastavnica.

7.2. Summary

Greater or broadleaf plantain (*Plantago major* L., Plantaginaceae) is a widespread plant, known in folk medicine for many years. It contains numerous biologically active compounds including flavonoids, alkaloids, terpenoids, iridoids, vitamins, polysaccharides, fatty and phenolic acids. Due to its chemical constituents, it has numerous biological effects. For example, it promotes wound healing, prevents viral and bacterial infections, it is useful in treatment of diarrhea, and lowers the level of glucose and cholesterol in the blood. Polyphenols act as antioxidants, anti-inflammatory and reduce the risk of some chronic diseases, eg cardiovascular. In this work, a fast and efficient extraction method, ultrasonic extraction, was used for the extraction of polyphenols from *P. major*. The amount of total polyphenols, flavonoids and phenolic acids was determined spectrophotometrically. Verbascoside concentration was determined using HPLC. By comparing the concentrations of the target compounds and the conditions in which extracts were prepared, the parameters necessary for the most efficient extraction of individual polyphenols were established. The extract with the highest content of total polyphenols was prepared using 70 % GL, 5 % lactic acid and was extracted for 30 min at a temperature of 70 °C with an ultrasound power of 144 W. Flavonoids were best extracted using 70 % GL, without lactic acid, and the extraction lasted 30 min at 70 °C with an ultrasound power of 720 W. The most suitable medium for phenolic acid was with 10 % GL, 0.3 mmol HP- β -CD, and the extraction lasted 30 min at 20 °C with an ultrasound power of 144 W. The extract with 10 % GL, 5% lactic acid, 0.3 mmol HP- β -CD showed the highest verbascoside extraction, and the extraction time was 10 min at 20 °C and with an ultrasound power of 144 W. It is still necessary to statistically process the results in order to precisely determine how certain parameters affect the extraction of all the mentioned polyphenol components

8. PRILOZI

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

Naziv ekstrakta	TP (KK) (µg/mL)	TP (GK)* (µg/mL)	TF (µg/mL)	TPA (µg/mL)	Ver (µg/mL)
E1	1514,93	757,465	95,24	106,31	121,82
E2	2066,61	1033,305	29,360	156,64	158,78
E3	1604,29	802,145	75,21	1077,30	139,43
E4	940,49	470,245	68,15	1396,80	0
E5	1133,26	566,63	195,42	339,38	43,85
E6	1577,59	788,795	133,28	667,22	97,65
E7	958,09	479,045	129,88	1086,70	20,99
E8	972,69	486,345	64,68	1453,94	12,68
E9	902,19	451,095	100,68	939,29	0
E10	1876,30	938,15	73,20	1073,05	134,82
E11	912,52	456,26	93,54	780,49	25,309
E12	886,53	443,265	149,92	1453,04	21,38
E13	1337,27	668,635	47,36	654,07	185,73
E14	959,52	479,76	81,32	869,45	12,84
E15	1010,43	505,215	107,81	1243,09	33,73
E16	2118,40	1059,2	108,49	417,73	121,96
E17	1076,29	538,145	78,94	776,29	118,83
E18	1387,82	693,91	212,41	867,64	95,76
E19	1116,17	558,085	22,23	234,56	150,95
E20	550,43	275,215	79,28	880,34	0
E21	1255,73	627,865	40,57	1105,70	180,19
E22	1066,33	533,165	144,48	1088,01	32,64
E23	1423,07	711,535	66,38	1256,70	170,54
E24	1321,60	660,8	18,83	1319,72	101,90
E25	1426,27	713,135	252,81	1045,39	136,00
E26	1545,90	772,95	176,75	1260,32	79,29
E27	1713,59	856,795	186,26	1061,57	54,080
E28	1414,17	707,085	191,35	1155,12	123,10
E29	1770,91	885,455	65,36	896,74	165,92
E30	1223,69	611,845	33,09	782,96	192,60
E31	1176,34	588,17	134,97	1068,94	32,91
E32	1160,67	580,335	55,51	618,70	107,04

TP = ukupni polifenoli, TPA = ukupne fenolne kiseline, TF = ukupni flavonoidi, Ver = verbaskozid, KK = kavena kiselina, GK = galna kiselina. Nazivi i uvjeti pripreme ekstrakata navedeni su u tablici 1. * rezultati TP (GK) su prikazani radi lakše usporedbe s literaturnim izvorima.

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 *Plantago major* L

Matea Katavić

SAŽETAK

Veliki ili širokolisni trputac (*Plantago major* L., Plantaginaceae) je široko rasprostranjena biljka, koja je poznata u narodnoj medicini već dugi niz godina. Sadrži brojne biološki aktivne spojeve, a to su: flavonoidi, alkaloidi, terpenoidi, iridoidi, vitamini, polisaharidi, masne i fenolne kiseline. Zahvaljujući svom kemijskom sastavu posjedu brojne biološke učinke. Primjerice, pomaže u zacjeljivanju rana, koristan je kod dijareje, pomaže u prevenciji virusnih i bakterijskih infekcija, te snižava razinu glukoze i kolesterola u krvi. Polifenoli djeluju protuupalno, antioksidacijski, te smanjuju rizik od nekih kroničnih bolesti, npr. kardiovaskularnih. U ovom radu je za ekstrakciju polifenola iz *P. major* korištena brza i učinkovita metoda ekstrakcije, ultrazvučna ekstrakcija. Spektrofotometrijski je određena količina ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina. Koncentracija verbaskozida određena je korištenjem HPLC-a. Usporedbom koncentracija spojeva i uvjeta pripreme ekstrakta ustanovilo se koji su parametri uvjetovali najefikasniju ekstrakciju pojedinih polifenola. Najveći sadržaj ukupnih polifenola imao je ekstrakt koji sadrži 70 % GL, 5 % mliječne kiseline, a ekstrahirao se 30 min pri temperaturi od 70°C i snazi ultrazvuka od 144 W. Flavonoidi su se najbolje ekstrahirali sa 70 % GL, bez mliječne kiseline, a ekstrakcija je trajala 30 min pri 70 °C i snazi ultrazvuka od 720 W. Fenolnim kiselinama je odgovarao medij s 10 % GL i 0,3 mmol HP-β-CD, a ekstrakcija je trajala 30 min pri 20 °C i snazi ultrazvuka od 144 W. Ekstrakcija verbaskozida je najučinkovitije provedena s 10 % GL, 5% mliječne kiseline i 0,3 mmol HP-β-CD, a ekstrakcijsko vrijeme je bilo 10 min na 20 °C i pri snazi ultrazvuka od 144 W. Potrebno je statistički obraditi rezultate kako bi se preciznije odredilo koliko pojedini parametri utječu na ekstrakciju svih navedenih polifenolnih sastavnica.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Trputac, polifenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, verbaskozid, ultrazvučna ekstrakcija

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

Ultrasound-assisted extraction of polyphenolics of *Plantago major* L

Matea Katavić

SUMMARY

Greater or broadleaf plantain (*Plantago major* L., Plantaginaceae) is a widespread plant, known in folk medicine for many years. It contains numerous biologically active compounds including flavonoids, alkaloids, terpenoids, iridoids, vitamins, polysaccharides, fatty and phenolic acids. Due to its chemical constituents, it has numerous biological effects. For example, it promotes wound healing, prevents viral and bacterial infections, it is useful in treatment of diarrhea, and lowers the level of glucose and cholesterol in the blood. Polyphenols act as antioxidants, anti-inflammatory and reduce the risk of some chronic diseases, eg cardiovascular. In this work, a fast and efficient extraction method, ultrasonic extraction, was used for the extraction of polyphenols from *P. major*. The amount of total polyphenols, flavonoids and phenolic acids was determined spectrophotometrically. Verbascoside concentration was determined using HPLC. By comparing the concentrations of the target compounds and the conditions in which extracts were prepared, the parameters necessary for the most efficient extraction of individual polyphenols were established. The extract with the highest content of total polyphenols was prepared using 70 % GL, 5 % lactic acid and was extracted for 30 min at a temperature of 70 °C with an ultrasound power of 144 W. Flavonoids were best extracted using 70 % GL, without lactic acid, and the extraction lasted 30 min at 70 °C with an ultrasound power of 720 W. The most suitable medium for phenolic acid was with 10 % GL, 0.3 mmol HP- β -CD, and the extraction lasted 30 min at 20 °C with an ultrasound power of 144 W. The extract with 10 % GL, 5% lactic acid, 0.3 mmol HP- β -CD showed the highest verbascoside extraction, and the extraction time was 10 min at 20 °C and with an ultrasound power of 144 W. It is still necessary to statistically process the results in order to precisely determine how certain parameters affect the extraction of all the mentioned polyphenol components.

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

Thesis includes: 38 pages, 12 figures, 2 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Plantain, polyphenols, flavonoids, phenolic acids, verbascoside, ultrasound extraction

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. *Postdoct*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2022.