

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2016.

Marija Jakelić

737/N



**JEDNOSTAVNI I PARCIJALNO-  
LINEARNI REGRESIJSKI MODELI  
PRIMIJENJENI NA RAZLIČITIM  
SVOJSTVIMA VODENIH BILJNIH  
EKSTRAKATA**



Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof. dr.sc. Jasenke Gajdoš Kljusurić, te uz pomoć dr.sc. Maje Benković i dr.sc. Davora Valingera. Ovaj rad doprinos je projektu “Primjena mikroreaktora u praćenju antioksidacijske aktivnosti samoniklog bilja (MICRO-AA)“, projektni broj HR.3.2.01-0069, koji je financiran iz Europskog socijalnog fonda (ESF) putem Operativnog programa Razvoj ljudskih potencijala.



## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof.dr.sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na ukazanoj prilici, strpljenju i posvećenom vremenu. Također, zahvaljujem se dr.sc. Maji Benković i dr.sc. Davoru Valingeru na pristupačnosti i pomoći prilikom izvedbe ovoga rada.*





## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### JEDNOSTAVNI I PARCIJALNO-LINEARNI REGRESIJSKI MODELI PRIMIJENJENI NA RAZLIČITIM SVOJSTVIMA VODENIH BILJNIH EKSTRAKATA

*Marija Jakelić, 737/N*

**Sažetak:** Iako se biljni čajevi, odnosno vodeni ekstrakti samoniklog bilja koriste u ljudskoj prehrani još od davnina, njihova svojstva još uvijek nisu dovoljno istražena. Posljednjih godina sve se više istraživanja na području nutricionizma bavi proučavanjem antioksidansa, a upravo samoniklo bilje bogato je polifenolima koji čine veliku skupinu spojeva s antioksidacijskom aktivnosti. U ovom radu ispitivani su ekstrakti 6 biljaka: Gospina trava, Kadulja, Lavanda, Majčina dušica, Melisa i Neven. Provedene su po dvije ekstrakcije za svaku biljku od kojih su uvjeti ekstrakcije provedeni kroz dva tretmana, a tretman 1 proveden je pri 40°C, 90 min i 750 o/min te tretman 2: 80°C, 60 min pri 250 o/min. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti fizikalna svojstva vodenih biljnih ekstrakata, udio ukupnih polifenola (UF) i antioksidacijsku aktivnost (AOA) DPPH metodom i metodom po Briggs-Rauscheru te pomoću jednostavnih regresijskih modela vidjeti u kakvom su odnosu promatrani parametri ovisno o različitim uvjetima ekstrakcije. Rezultati regresijskih modela pokazuju različitu ovisnost AOA o koncentraciji UF, obzirom na tretman ekstrakcije i mjernu metodu. Provela se i NIR spektroskopska analiza uzoraka čiji spektri su korišteni u modelima parcijalne linearne regresije. Primjenom modela parcijalne linearne regresije (PLS) u NIR spektroskopskoj analizi dobiven je dobar model za predikciju udjela polifenola u uzorku ( $R^2 > 0,89$ ).

**Ključne riječi:** samoniklo ljekovito bilje, biljni čajevi, antioksidacija, polifenoli, NIR spektroskopija

**Rad sadrži:** 43 stranice, 13 slika, 6 tablica, 56 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Izv.prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić*

**Pomoć pri izradi:** *Dr.sc. Maja Benković, Dr.sc. Davor Valinger*

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

- 1. Prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić*
- 2. Izv.prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić*
- 3. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković*
- 4. Doc.dr.sc. Martina Bituh (zamjena)*

**Datum obrane:** rujan, 2016.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Process engineering  
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### SIMPLE AND PARTIALLY-LINEAR REGRESSION MODELS APPLIED TO DIFFERENT PROPERTIES OF AQUEOUS PLANT EXTRACTS

*Marija Jakelić, 737/N*

**Abstract:** Although herbal teas or aqueous extracts of medical plants are used in the human diet since ancient times, their properties have not yet been sufficiently explored. In recent years the focus of nutrition studies is based on antioxidant contribution, and medical plants are rich in polyphenols that are a group of compounds with antioxidant activity. In this study the extracts of six medical plants are investigated (St. John's Wort, Sage, Lavender, Thyme, Lemon balm and Marigold). Two treatments conditions were used in preparation of aqueous extracts, treatment 1: was carried out at 40°C, 90 min & 750 r/min; while treatment 2 conditions were: 80°C, 60 minutes at 250 r/min. The aim of this study was to determine the physical properties of aqueous plant extracts, the share of total polyphenols (UF) and antioxidant activity (AOA) which was determined by use of two methods: DPPH method and the Briggs-Rauscher method. Simple regression models were used to determine the relationship of the observed parameters depending on different extraction conditions. Results of simple regression models showed different trends in the relationship of AOA vs. UF, due to the treatment of extraction and measurement method. NIR spectroscopic analysis of samples was also conducted and used in the partial linear regression modeling (PLS). Using the model of partial linear regression (PLS), the NIR spectra gave a good model for predicting the content of polyphenols in the sample ( $R^2 > 0,89$ ).

**Keywords:** wild medical plants, herbal teas, antioxidant, polyphenols, NIR spectroscopy

**Thesis contains:** 43 pages, 13 figures, 6 tables, 56 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Assoc. prof.*

**Technical support and assistance:** *PhD. Maja Benković, PhD. Davor Valinger*

#### Reviewers:

1. *PhD. Ines Panjkota Krbavčić, Full Professor*
2. *PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Associate professor*
3. *PhD. Ksenija Marković, Associate professor*
4. *PhD. Martina Bituh, Assistant professor (substitute)*

**Thesis defended:** September, 2016.



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. SAMONIKLO BILJE U SLUŽBI ZDRAVLJA	2
2.1.1. <i>Gospina trava</i>	2
2.1.2. <i>Kadulja</i>	3
2.1.3. <i>Lavanda</i>	3
2.1.4. <i>Majčina dušica</i>	3
2.1.5. <i>Melisa</i>	4
2.1.6. <i>Neven</i>	4
2.2. MJERNE METODE PRAĆENJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA I FIZIKALNIH SVOJSTAVA BILJNIH EKSTRAKATA	4
2.2.1. <i>Slobodni radikali</i>	5
2.2.2. <i>Antioksidansi</i>	5
2.2.3. <i>Fenolni spojevi</i>	6
2.2.4. <i>Ekstrakcija fenolnih spojeva</i>	7
2.2.5. <i>Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti</i>	7
2.2.6. <i>Mjerenje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom</i>	9
2.2.7. <i>Praćenje vodljivosti i TDS-a</i>	9
2.2.8. <i>Blisko-infracrvena spektroskopija</i>	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>11</b>
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. <i>Uzorci</i>	11
3.1.2. <i>Otapala i reagensi</i>	11
3.1.3. <i>Aparatura i pribor</i>	12
3.2. METODE	13
3.2.1. <i>Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva</i>	13
3.2.2. <i>Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata</i>	13
3.2.3. <i>Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja</i>	14
3.2.4. <i>Određivanje udjela ukupnih fenola</i>	15
3.2.5. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom</i>	17
3.2.6. <i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom</i>	18
3.2.7. <i>NIR spektroskopija</i>	20
3.2.8. <i>Obrada podataka i modeli</i>	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>23</b>
4.1. REZULTATI FIZIKALNIH SVOJSTAVA EKSTRAKTA	24
4.2. REZULTATI MASENIH KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA	26
4.3. REZULTATI MJERENJA ANTIOKSIDACIJSKIH AKTIVNOSTI	27
4.4. BLISKO-INFRAČRVENA SPEKTROSKOPIJA	28
4.4.1. <i>Analiza glavnih komponenti, PCA</i>	29
4.5. REGRESIJSKI MODELI ODNOSA PROMATRANIH PARAMETARA	32
4.6. PARCIJALNI LINEARNI REGRESIJSKI MODELI ODNOSA NIR SPEKTARA I UKUPNIH POLIFENOLA	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>38</b>
<b>7. PRILOZI</b>	<b>44</b>



# 1. UVOD

Samoniklo bilje od davnina je u ljudskoj upotrebi, a većinom se koristilo u „narodnoj medicini“ za oblaganje rana i pripravljanje napitaka. U današnje vrijeme, kada se ljudi se sve više okreću prirodi i tamo traže svoje saveznike zdravlja, upravo samoniklo bilje dobiva na značaju kao važan izvor blagotvornih bioaktivnih tvari, prije svega antioksidanasa, čiji se pozitivni učinci na organizam sve više dokazuju. Upravo zbog toga, i struka je prepoznala važnost biljnih vodenih ekstrakata i čajeva kao posebne skupine hrane čija svojstva još nisu dovoljno istražena.

U ovom radu istraživani su vodeni ekstrakti 6 različitih samoniklih biljaka koje se najčešće koriste za pripremanje tzv. biljnih čajeva: Gospina trava, Kadulja, Lavanda, Majčina dušica, Melisa, Neven. Za svaku biljku provedene su dvije ekstrakcije koje se međusobno razlikuju u temperaturi ekstrakcije, vremenu ekstrakcije i brzini miješanja. Ekstraktima su zatim izmjerena fizikalna svojstva (pH, TDS, vodljivost i suha tvar), udio ukupnih polifenola i izmjerene antioksidacijske aktivnosti dvjema metodama: DPPH metodom i metodom po Briggs-Rauscheru koja simulira uvjete slične onima u ljudskom probavnom sustavu pa se smatra da daje informacije o antioksidacijskoj aktivnosti uzorka (biljnih vodenih ekstrakata) nakon ingestije. Također, korištena je i jedna od novijih metoda analize uzoraka, NIR spektroskopija.

Cilj ovog rada bio je ispitati odnos fizikalnih parametara u vodenim biljnim ekstraktima s obzirom na uvjete ekstrakcije, odrediti koncentraciju ukupnih polifenola u pojedinim ekstraktima i izmjeriti im antioksidacijsku aktivnost dvijema različitim metodama. Također, htjelo se ispitati i kakva je ovisnost između koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti ovisno o tretmanima i korištenim metodama, te na koji se način NIR spektroskopija kao metoda može pridonijeti u daljnjim istraživanjima ekstrakata samoniklih biljaka.

## 2. TEORIJSKI DIO

Prof. Živković u svojoj knjizi Hranom do zdravlja (2000) pojašnjava kako grčka riječ *díaita* (od koje potječe hrvatska riječ dijeta) znači ne samo hrana nego i život. A prema Zakonu o hrani (Zakon, 2014) – „hrana je svaka tvar ili proizvod prerađen, djelomično prerađen ili neprerađen, a namijenjen je konzumaciji ili se može opravdano očekivati da će ga ljudi konzumirati“. Jednu posebnu skupinu hrane čine pripravci koji se koriste kao čajevi, vodeni ili alkoholni ekstrakti, a pripravljaju se od samoniklog bilja.

### 2.1. SAMONIKLO BILJE U SLUŽBI ZDRAVLJA

Velik je broj dokaza kako ljekovito bilje predstavlja najstariji i najrašireniji oblik liječenja. Najstariji zapisi o korištenju biljnih pripravaka za liječenje određenih tegoba datiraju još iz vremena 3000 godina prije Krista (Halberstein, 2005). U novije vrijeme sve se više proučava ljekovito bilje kao značajan izvor antioksidansa, točnije fenolnih spojeva (Kratchanova i sur., 2010) zbog njihove uloge u prevenciji kroničnih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom (Hollman, 2001).

#### 2.1.1. Gospina trava

**Gospina trava** (*Hypericum perforatum*) porodice *Hypericeae*, višegodišnja je zeljasta biljka porijeklom iz Azije i Europe (Barnes i sur., 2001). Raste po suhim travnjacima i kamenjarskim pašnjacima. Bere se krajem lipnja kad je u punom cvatu (Martinić, 2011). U širokoj je primjeni za razna stanja poput kožnih rana, ekcema, opekotina, bolesti probavnog sustava i psihičkih tegoba. U današnje vrijeme istaknuta je upotreba za liječenje blage depresije. Komercijalno se najviše koristi u obliku nutraceutika, čajeva, tinktura i uljnih mascerata (Silva i sur., 2005). Navodi se da posjeduje sedativna i adstringentna svojstva te se tradicionalno koristi za liječenje razdražljivosti, tjeskobe, depresije, neuralgije, fibrozitisa, išijasa i menopauzalnih neuroza (Barnes i sur., 2001). Istraživanja također potvrđuju kako ekstrakti gospine trave pokazuju značajna antioksidativna svojstva (Hunt i sur., 2001).



### 2.1.2. Kadulja

**Kadulja** (*Salvia officinalis*) je višegodišnja grmolika drvenasta biljka porijeklom sa Mediterana (Santos Gomes i sur., 2002). Ljekovita je i aromatična pripadnica porodice *Laminaceae*. Raste uglavnom u području priobalnih i krških planina. Ljekovita, aromatična, antiseptička i antioksidativna svojstva opravdavaju upotrebu eteričnog ulja u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Žutić, 2007). Razne vrste ekstrakata ove biljke koriste se za liječenje upala usne šupljine i probavnog trakta, gastritisa i tonzilitisa. Ljekovitost se uglavnom pripisuje fenolnim kiselinama, fenolnim glikozidima, diterpenoidima i flavonoidima koje sadrži u velikim količinama a koji posjeduju brojne biološke aktivnosti, prvenstveno antitumorske, antivirusne i antioksidativne (Capek i Hřibalová, 2004).

### 2.1.3. Lavanda

**Lavande** (*Lavandula spp.*) cvjetajuće su biljke porodice *Laminaceae* rasprostranjene po Sredozemnoj regiji, Arapskom poluotoku Kanarskim otocima i Indiji. Ulja lavande koriste se za poticanje sna, otklanjanje anksioznosti i kod liječenja demencije. Osim hlapljivih spojeva, lavanda sadrži fitosterole, fenolne kiseline i flavonoide koji djeluju kao antioksidansi (Gonçalves i Romano, 2013).

### 2.1.4. Majčina dušica

**Majčina dušica** (*Thymus serpyllum*) višegodišnja je zeljasta biljka vrlo aromatičnog mirisa i okusa. Raste u spontanoj flori Sjeverne Afrike i većini Europskih zemalja. Cvjeta od lipnja do listopada i raste uglavnom na kamenitim i pjeskovitim mjestima. Majčina dušica se dugo koristi kao tradicionalni lijek za zdravstvene tegobe. Eterično ulje sadrži komponente koje su dokazani antibiotici i dezinficijensi. Koristi se za ublažavanje bolova kod reumatizma, gihta i išijasa. Dokazana je i efikasnost u tretmanu kašlja, bronhitisa i upala gornjih dišnih puteva. Istraživanja također potvrđuju i snažnu antioksidativnu aktivnost ekstrakta zahvaljujući

sinergizmu brojnih fenolnih komponenata, dok se kao najznačajniji antioksidansi navode timol i karvakrol (Čančarević i sur., 2013).

#### 2.1.5. Melisa

**Melisa** (*Melissa officinalis* L.) višegodišnja je biljka iz porodica *Lamiaceae* (usnjača). Porijeklom je iz Sredozemlja i Male Azije. U Republici Hrvatskoj raste samoniklo na vlažnim i šumovitim terenima. Počinje rasti početkom travnja a cvijeta od sredine lipnja do sredine srpnja. Vrijeme žetve je od lipnja do rujna (Firšt Godek, 2003). Lišće podvrste *officinalis* se upotrebljava se za pripremu biljnog čaja za ublažavanje poremećaja spavanja i probavnih tegoba, zahvaljujući aromatskim i antispazmotskim svojstvima (Carnat i sur., 1998).

#### 2.1.6. Neven

**Neven** (*Calendula officinalis*) je zeljasta jednogodišnja biljka iz porodice *Lamiaceae* (usnjača). Domovinom nevena smatra se područje Sredozemlja, a u Europi je poznat od 12. stoljeća (Firšt Godek, 2003). Terapeutska svojstva nevena pripisuju se nizu različitih bioaktivnih tvari koje sadrži. Zbog protuupalnih, zacjeljujućih i antiseptičkih svojstava ekstrakti nevena koriste se za vanjsku upotrebu za liječenje kožnih upala, ekcema i konjunktivitisa i ingestivno za ublažavanje boli kod upalnog stanja želuca (Butnariu i Zepa Corandi, 2012).

## **2.2. MJERNE METODE PRAĆENJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA I FIZIKALNIH SVOJSTAVA BILJNIH EKSTRAKATA**

U današnje vrijeme sve se više prepoznaje uloga pravilne prehrane u očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti. Pravilna prehrana trebala bi se temeljiti na unosu nutritivno bogatih namirnica koje osiguravaju organizmu energiju, gradivne komponente, vlakna, vitamine i minerale. Užurbani stil života, danas prisutan kod većine populacije, jedan je od glavnih

uzročnika stresa koji pridonosi pojavi kroničnih nezaraznih bolesti. Također, prehrana „modernog“ čovjeka uglavnom uključuje konzumiranje energetski bogate ali nutritivno siromašne, najčešće gotove i prerađene industrijske hrane koja ne pogoduje očuvanju zdravlja već i sama predstavlja određeni stres za sam organizam. Upravo zbog toga, sve se više istražuje hrana bogata antioksidansima koji smanjuju oksidacijski stres u organizmu i tako pomaže u očuvanju zdravlja.

### 2.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali mogu se definirati kao bilo koja molekulska vrsta sposobna za samostalno postojanje koja sadrži nespareni elektron u orbitali. Prisutnost nesparenog elektrona uzrokuje nestabilnost i visoku reaktivnost molekule. Slobodni radikali mogu donirati elektron ili primiti elektron od drugih molekula, odnosno mogu biti oksidansi ili reducensi. Reaktivne kisikove vrste (eng. Reactive oxygen species- ROS) prisutne u organizmu mogu biti neradikalne ili kao slobodni radikali. Neradikalne kisikove vrste su: vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singlet kisik ( $1O_2$ ), hipokloritna kiselina ( $HOCl$ ) i ozon ( $O_3$ ). Slobodni radikali su: superoksid radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), lipidi peroksil radikal ( $LOO^{\cdot}$ ) i hidrosil radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Također su prisutni i reaktivni oblici dušika (eng. Reactive nitrogen species- RNS): dušikov (II)- oksid radikal i dušikov (IV)- oksid radikal. Slobodni radikali formiraju se u organizmu bilo kao produkti normalnog metabolizma ili kao posljedica izloženosti vanjskim utjecajima kako što su X-zrake, ozon, dim cigarete, zagađeni zrak, industrijske kemikalije, lijekovi i dr. Proizvodnja slobodnih radikala u određenoj koncentraciji nužna je za funkcioniranje imunološkog sustava, međutim ako je narušena ravnoteža između nastajanja i neutraliziranja slobodnih radikala dolazi do oksidativnog stresa koji uzrokuje oštećenje proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljikohidrata. Posljedice takvih oštećenja su ateroskleroza, upalne bolesti, dijabetes, rak i druge kronične nezarazne bolesti (Lobo i sur., 2010; Fürst, 2009).

### 2.2.2. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koji u biološkim sustavima neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala. Antioksidacijska obrana temelji se na sprječavanju nastanka slobodnih radikala, njihovu uklanjanju putem enzima kao i popravku nastalog oštećenja molekula. Antioksidansi

stupaju u reakcije sa slobodnim radikalima, doniraju im elektron ili proton te ih na taj način inaktiviraju. Enzimi s antioksidacijskom ulogom u organizmu su: superoksid – dismutaza, glutation-peroksidaza i katalaza. Drugu liniju antioksidacijske obrane čine esencijalni mikronutrijenti (vitamini E i C, karoteni, selen) i nenutritivne komponente (fenolni spojevi i njihovi derivati) (Fijačko, 2013; Fürst, 2009).

### 2.2.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi ili polifenoli čine jednu od glavnih skupina sekundarnih biljnih metabolita koja ima brojne značajne fiziološke uloge u biljkama (Lattanzio, 2013). Iako se radi o heterogenoj skupini spojeva, osnovno obilježje polifenola prisutnost je jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Berend i Grabarić, 2008).

Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na:

- 1) Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne)
- 2) Flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani i dr.)
- 3) Tanine (kondenzirani i hidrolizirani)
- 4) Ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini) (Naczki i Shahidi, 2006).

Glavni izvori polifenola u prehrani su voće i piće (vino, čaj, kava, čokolada i pivo) te u manjoj mjeri povrće, suhe mahunarke i žitarice (Scalbert i Williamson, 2000). Osim što su jedni od glavnih nositelja senzorskih osobina hrane, sve se više istraživanja bavi njihovim brojnim pozitivnim fiziološkim učincima. Brojna epidemiološka istraživanja sugeriraju kako dugotrajna konzumacija hrane i pića bogatih polifenolima smanjuje rizik od razvoja tumora, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

Antioksidativna aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres. Ujedno, polifenoli imaju sposobnost keliranja metala koji su uključeni u formiranje slobodnih radikala te vezanja ugljikohidrata i proteina pomoću hidroksilnih skupina (Berend i Grabarić, 2008).

#### 2.2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija je jedna od metoda za pročišćavanje i za izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (ekstrakcija tekuće-tekuće) ili čvrste faze (ekstrakcija čvrsto-tekuće), organsko otapalo koje se koristi za ekstrakciju treba zadovoljiti slijedeće uvijete: mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topivost u tom otapalu, otopina iz koje tvar ekstrahiramo i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći, otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se moglo nakon ekstrakcije lako ukloniti, i otapalo mora biti što manje zapaljivo, otrovno i jeftino (Jerković i Radonić, 2009).

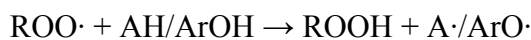
Ekstrakcija polifenolnih spojeva složena je zbog njihove kemijske strukture i interakcija s ostalim spojevima iz biljaka. Brojni faktori kao što su sastav otapala, vrijeme ekstrakcije, temperatura, pH, omjer prelaska iz krutog u tekuće i veličina čestica mogu značajno utjecati na rezultat ekstrakcije. Polarnost polifenolnih spojeva seže od polarnih do nepolarnih pa se stoga za ekstrakciju koriste i različita otapala (voda, aceton, metanol, etanol). U ovom radu ispitivana je antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata samoniklog bilja, jer su upravo vodeni ekstrakti, odnosno biljni čajevi i tinkture najznačajniji i najzastupljeniji u svakodnevnoj prehrani.

#### 2.2.5. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Kemijska raznolikost prirodnih antioksidanasa otežava odjeljivanje, detekciju i kvantifikaciju pojedinačnog antioksidanta iz složenog biološkog matriksa. Osim toga, ukupni antioksidativni kapacitet značajniji je za utvrđivanje blagotvornog zdravstvenog učinka zbog sinergističkog djelovanja antioksidacijskih vrsta.

Metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta mogu se u grubo podijeliti na metode temeljene na prijenosu elektrona (eng. electron transfer-ET) i metode temeljene na prijenosu vodika (eng. hydrogen atom transfer- HAT). Rezultati dobiveni različitim metodama teško su usporedivi upravo zbog različitog mehanizma reakcija, redoks potencijala, pH i sl. (Apak i sur., 2013).

**HAT- metode** mjere sposobnost antioksidansa da „ugase“ slobodne radikale donirajući im H atom. Mehanizam antioksidativnog djelovanja u kojem se vodikov atom (H) fenolnih spojeva (Ar-OH) prenosi na slobodni radikal (ROO·) može se prikazati reakcijom:



gdje je fenoksil radikal, nastao reakcijom fenola i peroksid radikala, stabilan zahvaljujući rezonanciji. U HAT- metode spadaju:

- ORAC metoda (Oxygen radical absorbance capacity)
- TRAP metoda (Total reactive antioxidant potential)

**ET- metode** se većinom baziraju na simulaciji antioksidativne aktivnosti s probom odgovarajućeg redoks potencijala. Antioksidans reagira s fluorescentnom probom (oksidirajućim sredstvom) umjesto s peroksidoidnim radikalom. Spektrofotometrijske metode mjere kapacitet antioksidansa za redukciju oksidansa koji mijenja boju kada je reduciran. Stupanj promjene boje (bilo porast ili smanjenje apsorbancije probe pri određenoj valnoj duljini) u korelaciji je s koncentracijom antioksidansa u uzorku. Metode bazirane na prijenosu elektrona imaju određeno vrijeme trajanja za određene redoks reakcije i mjere termodinamičku pretvorbu, odnosno oksidaciju, u tom vremenskom razdoblju. Iako reducirajući kapacitet uzorka nije direktno povezan sa sposobnošću „hvatanja“ slobodnih radikala, to je značajna karakteristika antioksidanasa. U ET- metode spadaju:

- TEAC metoda (trolox-equivalent antioxidant capacity);
- DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrihidrazilom) (Brand-Williams i sur, 1995);
- FCR (folin-Ciocalteu reagens);
- FRAP (Flourescence recovery after photobleaching);
- CUPRAC (Cupric iron reducing antioxidant capacity)(Apak i sur., 2007)

iako neki autori svrstavaju TEAC i DPPH metode u kombinirane HAT/ET metode (Apak i sur., 2013).

Uz navedene metode koriste se i druge, a u novije vrijeme za određivanje antioksidacijske aktivnosti sve se više primjenjuje Briggs-Rauscher metoda (Cervellati i sur., 2001) koja je ujedno korištena i u ovom radu.

### 2.2.6. Mjerenje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom

Briggs-Rauscher reakcija jedna je od najčešće proučavanih oscilirajućih reakcija koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih otopina. Tijekom reakcije komponente prolaze kroz periodične oscilacije popraćene promjenom boje reakcijske smjese. Dodatkom antioksidansa iz biljaka dolazi do naglog prigušenja (inhibicije) osciliranja. Reakcija se prati potencijometrijski kako bi se precizno izmjerilo vrijeme inhibicije oscilacije reakcije koje je proporcionalno koncentraciji antioksidansa u uzorku.

Specifičnost metode je u tome što se reakcija odvija pri pH vrijednosti oko 2, što odgovara fiziološkoj pH vrijednosti želuca gdje se odvija glavina procesa probave, pa se smatra kako ova metoda može dati informacije o tome što se zapravo događa sa antioksidansima nakon ingestije i time pomoći u boljem razumijevanju uloge bioaktivnih komponenata u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti (Gajdoš Kljusurić i sur., 2005).

### 2.2.7. Praćenje vodljivosti i TDS-a

Ukupne otopljene krute tvari (eng. total dissolved solids-TDS) su spojevi u vodi koji se ne mogu ukloniti pomoću tradicionalnog filter papira, odnosno to su soli ili spojevi koji disociraju u vodi te formiraju ione (Bauder i Sigler, 2015). Električna vodljivost sposobnost je vodenih otopina da prenose struju, a ovisi o prisutnosti iona, njihovoj ukupnoj koncentraciji, o pokretljivosti i valenciji iona, te o temperaturi mjerenja (Dadić, 2012) i direktno je proporcionalna udjelu TDSa u vodi (Gajdoš Kljusurić i sur., 2015). Osnovna primjena ovih metoda je određivanja kvalitete i zdravstvene ispravnosti vode za piće i vode u prehrambenim industrijama.

### 2.2.8. Blisko-infracrvena spektroskopija

Blisko-infracrvena (eng. near infrared-NIR) spektroskopija je tehnika analiziranja uzoraka, a temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja valne duljine u rasponu od 780 do 2500 nm (Huang i sur., 2008) i glavna prednost NIR-a je u tome što nije potrebna (pred)priprema uzorka te je analiza vrlo jednostavna brza (između 15 i 90 sekundi) te se može provesti on-

line. On/in-line NIR metoda se u zadnjih 35 godina dokazala kao efikasna i napredna metoda za kontinuirano praćenje, kontrolu procesa i kvalitete proizvoda te kontrolu same procesne linije (Ozaki i sur., 2007; Huang i sur., 2008). Primjenjivost NIR spektroskopije je u tome da omogućava istovremeno mjerenje nekoliko sastavnih tvari (Nicolai i sur., 2007) te za svaku temeljnu vibraciju postoji odgovarajući niz overtona i kombinacija veza (Williams i sur., 1988) što omogućava više izbora apsorpcije različitih intenziteta koje sadrže iste kemijske informacije (C-H; O-H; N-H vibracije). NIR spektroskopija je našla svoju primjenu u prehrambenoj industriji i rutinski se koristi za analizu sastava te funkcionalnu i senzorsku analizu sastojaka hrane, procesnih međuprodukata i gotovih proizvoda (Hernández Gómez i sur., 2006). Ova metoda ima veliku ulogu u kontroli osnovnog kemijskog sastava hrane jer se pomoću nje može odrediti koncentracija svih hranjivih tvari (Liu i sur., 2010). Uzorci poljoprivrednih kultura kao npr. žitarice, prate se od samih početaka primjene NIR instrumenta u praćenju kvalitete prehrambenih proizvoda (Ozaki i sur., 2007) ali je pogodna za praćenje emulzija (Gajdoš i sur., 2015), vina (Budić Leto i sur., 2011), voća (Hernández Gómez i sur., 2006) i sl. otopina.



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci

Kao materijal u ovom radu korištene su osušene biljke:

- Gospina trava (*Hypericum perforatum* L.) iz Koprivničko-Križevačke županije; berba 2014.
- Kadulja (*Salvia officinalis*) iz Šibensko-Kninske županije; berba 2014.
- Lavanda (*Lavandula x hybrida* L.) iz Međimurske županije; berba 2015.
- Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) iz Koprivničko-Križevačke županije; berba 2015.
- Melisa (*Melissa officinalis*) iz Virovitičko-Podravske županije; berba 2014.
- Neven (*Calendula officinalis*) iz Koprivničko-Križevačke županije; berba 2014.

#### 3.1.2. Otapala i reagensi

Sljedeća otapala i reagensi su korišteni u eksperimentalnom radu:

- Destilirana voda
- Kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pa. (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol HPLC grade (J.T.Baker, Nizozemska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (SigmaAldrich, Njemačka)
- Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 30% (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Sulfatna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 96% (Carlo ErbaReagents, Pariz, Francuska)
- Kalijevjodata ( $\text{KIO}_3$ ), pa. (Fisher Chemical, Velika Britanija)
- Škroba, topljivi, pa. (Fisher Chemical, Velika Britanija)
- Malonska kiselina (Fisher Chemical, Velika Britanija)
- Manganov sulfat ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ ), extra čist (AcrosOrganics, SAD)
- Galna kiselina, 98 % (AcrosOrganics, SAD)
- Trolox (Fluka, Švicarska)

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Vodena kupelj (IKA HBR4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- Termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- Eksikator(Normax, Portugal)
- Vorteks (BiosanVortex V1 Pus, Latvija)
- Spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Engleska)
- Potenciometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- Konduktometar (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska)
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m,

#### Pribor:

- Filter papir
- Stakleni ljevak
- Staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 500 mL
- Odmjerna tikvica volumena 100 mL i 200 mL
- Menzura volumena 100 mL
- Metalna špatulica
- Aluminijske posudice s poklopcem
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete volumena 10 mL
- Pipete volumena 5 mL i 10 mL
- Mikropipete volumena 100  $\mu$ L i 500  $\mu$ L
- Kiveta od kvarcnog stakla

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva

Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva temelji se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010).

U staklenu čašu volumena 200 mL odvaže se 2 g usitnjenog osušenog samoniklog bilja te se prelije sa 100 mL destilirane vode prethodno zagrijane na laboratorijskom kuhalu na definiranu temperaturu. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na definiranu temperaturu na vodenoj kupelji, pri određenoj brzini miješanja, zadano vrijeme. Nakon isteka vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira pomoću filter papira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze.

Za svaku biljku provode se dva eksperimenta ekstrakcija pri različitim uvjetima temperature (T), veličine čestica (d), vremenu ekstrakcije (t) i broju okretaja (Tablica 1).

**Tablica 1.** Plan provedbe ekstrakcija

Broj eksperimenta	Temperatura T / °C	Veličina čestica d/ μm	Vrijeme t / min	Brzina miješanja o/min
1	40	3000-4000	90	750
2	80	3000-4000	60	250

U daljnjem tekstu se kao tretman 1 podrazumijeva prvi eksperiment (T=40 °C; t=90 min pri 450 o/min), dok se pod tretmanom 2 podrazumijevaju uvjeti drugog eksperimenta (T=80 °C; t=60 min pri 250 o/min).

### 3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata

Nakon ekstrakcije uzorci se ohlade na sobnu temperaturu i pomoću mjernog instrumenta sa elektrodom izmjere im se vrijednosti pH, TDS i električne vodljivosti.

Električna vodljivost predstavlja sposobnost otopine da prenosi struju i u pozitivnoj je korelaciji s količinom iona u otopini. U vodenim otopinama su ukupne otopljene tvari (eng.

Total dissolved solids – TDS) većinom prisutne kao ioni te se i one mogu mjeriti preko električne vodljivosti.

Vodljivost i ukupna otopljena suha tvar

Vodenom ekstraktu praćena je temperatura nakon provedenog postupka zagrijavanja na određenu temperaturu, pri određenoj brzini miješanja, određeno vrijeme. Kada je postignuta sobna temperatura mjerena sa Omron uređajem (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska) te je također očitana vodljivost te ukupna otopljena suha tvar (TDS).

Određivanje pH

Nakon mjerenja temperature, TDS-a i vodljivosti, vodenom ekstraktu izmjerena je pH vrijednost pomoću pH metara (Jenco 601A, SAD).

### 3.2.3. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda, koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1995)

U suhu i označenu posudicu stavi se kvarcni pijesak ( u količini dovoljnoj da prekrije dno posudice). Posudica se suši u sušioniku sa skinutim poklopcem na 105 °C. Nakon sušenja koje traje sat vremena od trenutka kada je postignuta temperatura od 105 °C, poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu s točnošću +/- 0,0002 g.

U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom otpipetira se volumen od 3 ml ekstrakta (dvije paralele za svaki uzorak). Sušenje uzoraka traje 4 sata pri 105 °C u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema jednadžbi:

$$\% \text{ vode} = (a-b) * 100 / m \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 - \% \text{ vode} \quad [2]$$

Gdje su:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

#### 3.2.4. Određivanje udjela ukupnih fenola

Princip metode temelji se na svojstvu fenolnih spojeva da tijekom reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom, koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, nastaje plavo obojeni kompleks čiji intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola. Pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Pinelo i sur., 2005).

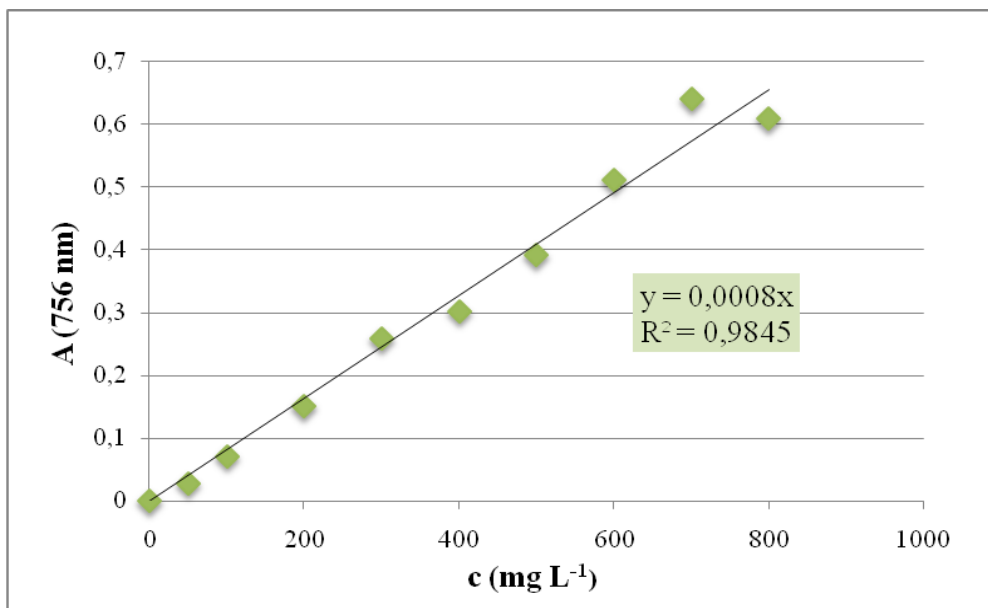
U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100  $\mu\text{L}$  uzorka 500  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa, i 1,5 mL 20%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te se reakcijska smjesa protrese na vorteks uređaju. Nakon dodatka 20%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa samo što umjesto uzorka sadrži 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost. Udio ukupnih fenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (0-800  $\text{mg L}^{-1}$ ) a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po litri ili gramu uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Pri izradi baždarnog pravca umjesto uzorka u reakcijsku se smjesu dodaju otopina galne kiseline poznatih koncentracija. Za pripremu baždarnog pravca pripremi se polazna otopina galne kiseline u koncentraciji 1  $\text{g L}^{-1}$ . Odvažuje se 0,1 g galne kiseline koja se prenese u

odmjernu tikvicu i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Iz pripremljene otopine naprave se razrjeđenja koja odgovaraju koncentracijama otopine galne kiseline 0 – 800 mg L<sup>-1</sup>. Reakcija se odvija 2 sata, nakon čega se mjeri apsorbanacija pri 756 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacija napravi se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm (slika 1). Pomoću dobivene jednadžbe pravca izračunava se koncentracija ukupnih fenola.



**Slika 1.** Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0008x \quad [3]$$

gdje je:

y– apsorbanacija pri 765 nm,

x – koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>).

R<sup>2</sup>- koeficijent determinacije

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode temelji se na sposobnosti redukcije DPPH radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) prilikom oksidacije fenolnih spojeva. DPPH radikal zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm) i ljubičaste je boje. Uz prisutnost elektron donora (antioksidanta) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona, odnosno stvaranjem reduciranog oblika DPPH-H. Reakcija se očituje promjenom boje iz ljubičaste u žutu, što se spektrofotometrijski prati kao pad apsorpcije pri 515 nm u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducenom (trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

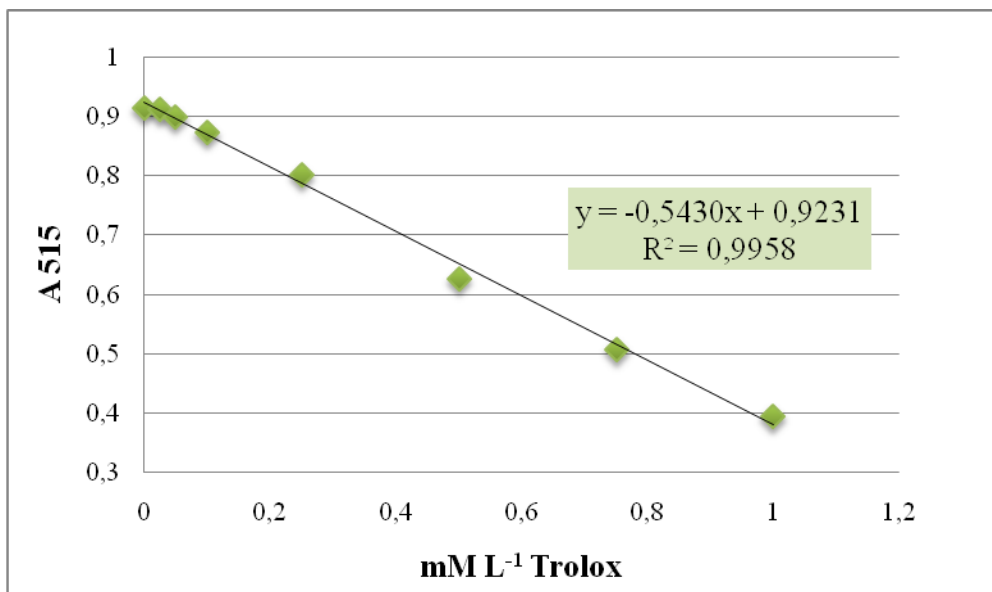
Pripremi se 0,094 mM otopina DPPH u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100  $\mu$ L ekstrakta i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te se smjesa dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 minuta u mrku nakon čega se mjeri apsorpcija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

#### Izrada baždarnog pravca

Baždarni dijagram izrađuje se primjenom poznatih koncentracija vodenih otopina Trolox-a (0 – 1 mM L<sup>-1</sup>), koje se dodaju u reakcijsku smjesu umjesto uzorka. Reakcija se odvija 30 minuta u mraku te se nakon toga odredi apsorpcija pri 515 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorpcije nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel s vrijednostima koncentracije troloxa (mM L<sup>-1</sup>) na apscisi i vrijednostima izračunatim kao razlika kontrole i apsorpcije na ordinati (slika 2).

Promjena apsorpcije DPPH radikala ( $\Delta A$ ), nakon reakcije s uzorkom, računa se oduzimanjem apsorpcije uzorka od apsorpcije slijepa probe. Rezultati  $\Delta A$  preračunaju se prema jednadžbi baždarnog pravca u koncentracije (mM L<sup>-1</sup> Trolox ekvivalenta) te se izražavaju kao molarni (mM g<sup>-1</sup>) ili maseni ( $\mu$ g g<sup>-1</sup> uzorka) ekvivalenta Troloxa.



**Slika 2.** Baždarni pravac za Trolox

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,543x + 0,9231$$

[4]

gdje je:

y = razlika kontrole i apsorbancije uzorka pri 515 nm

x = ekvivalent troloxa (TAE) (mM L<sup>-1</sup>)

R<sup>2</sup>- koeficijent determinacije

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom

Metoda se temelji na određivanju vremena inhibicije Briggs-Rauscher oscilirajuće reakcije dodatkom tvari koja ima antioksidacijska svojstva u reakcijsku smjesu. Vrijeme inhibicije Briggs-Rauscher oscilirajuće reakcije proporcionalno je količini i svojstvima tvari s antioksidacijskim djelovanjem (Gajdoš Kljusurić i sur., 2005).

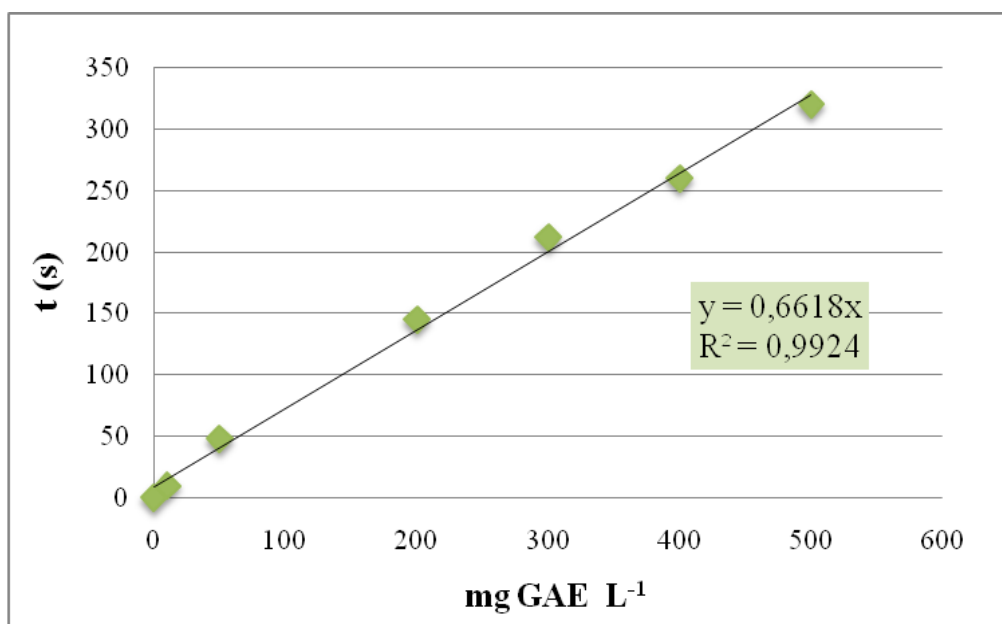
Potrebno je pripremiti tri otopine (A, B i C). Otopina A mora biti svježe pripremljena, a priprema se razrjeđenjem 30 %-tnog vodikovog peroksida destiliranom vodom u omjeru 1:1. Otopina B priprema se tako da se odvaži 4,3 g kalijevog jodata (KIO<sub>3</sub>) i prenese u tikvicu od 100 mL te se doda 50 mL destilirane vode i dobro izmiješa. Zatim se doda 0,45 mL koncentrirane sulfatne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina C



priprema se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL stavi 1,5 g malonske kiseline, 0,4 g manganovog sulfata ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) te se doda 15 mL prethodno pripremljene otopine škroba i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina škroba priprema se kuhanjem 0,1 g škroba u 100 mL vruće destilirane vode 5 min.

Briggs-Ruscher reakcije provode se u reakcijskoj smjesi pripremljenoj miješanjem otopina A, B i C. U čašu volumena 50 mL stavi se 10 mL otopine A i 10 mL otopine B. Smjesa se dobro promiješa te se doda 10 mL otopine C i nastavi miješati na magnetnoj miješalici (Heidolph MR-Mei Standard, Njemačka). Dolazi do promjene boje reakcijske smjese iz bezbojne u žutu pa u plavu i tako ciklički. Nakon treće pojave plavog obojenja u reakcijsku smjesu dodaje se 100  $\mu\text{L}$  uzorka te se pomoću potenciometrijske elektrode i uz pomoć računala prati vrijeme inhibicije, odnosno vrijeme do ponovne pojave plavog obojenja (ponovnih oscilacija).

Antioksidacijski potencijal računa se na osnovu baždarnog pravca galne kiseline koja se dodaje u reakcijsku smjesu umjesto uzorka ( $0\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ ).



**Slika 3.** Baždarni pravac za galnu kiselinu u BR reakciji

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,6618x$$

[5]

gdje je:

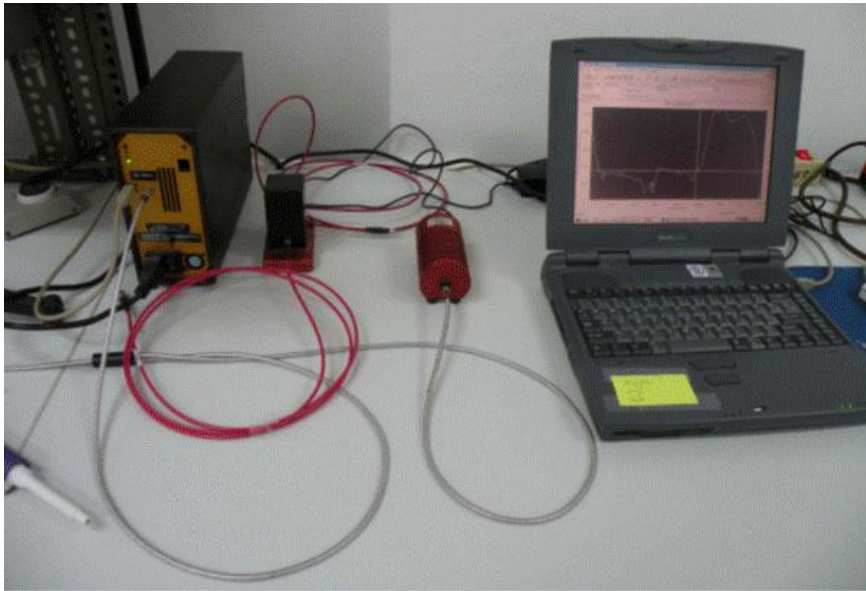
y = vrijeme inhibicije (s)

x = ekvivalent galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$R^2$ - koeficijent determinacije

### 3.2.7. NIR spektroskopija

Za snimanje vodenih ekstrakata biljaka pomoću NIR spektra koristio se NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m, sa instaliranim Control Development softverom Spec32 (slika 4). Uzorci su snimani u kivetama, u postolju koje ima poklopac kako ne bi bilo okolnog izvora svjetlosti. Snimanje spektra se provodilo tri puta te je izračunata srednja vrijednost od tri spektra.



**Slika 4.** Oprema korištena za snimanje NIR spektra

### 3.2.8. Obrada podataka i modeli

Programi *MS Excel 2010* (Redmond, SAD) i *Origin* korišteni su u analizi podataka primjenom deskriptivne statistike (srednje vrijednosti, standardna devijacija) te multivarijatne analize.

Također su primijenjeni linearni regresijski modeli kod baždarnih krivulja te s ciljem utvrđivanja statističke povezanosti jedne zavisne varijable (y) s jednom ili više nezavisnih varijabli (x):

$$y_i = a_i \cdot x_i + b_i + e_i \quad [6]$$

gdje je:

a, b – parametri modela; e – odstupanje od funkcionalnog odnosa (greška).

Reprezentativnost modela ocjenjena je koeficijentom determinacije ( $R^2$ ). Što je koeficijent bliži jedinici, model je reprezentativniji i odnos među promatranim varijablama se procjenjuje prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 2).

**Tablica 2.** Chadockova ljestvica

$R^2$	Značenje
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) je dobiven obradom rezultata u Microsoft Excel programu.

Program The Unscrambler X10.3 korišten je za obradu prikupljenih podataka NIR u kombinaciji sa multivarijatnom analizom, te su njime identificirani željeni podaci. Za analizu uzoraka koristila se kemometrijska metoda za analizu glavnih komponenti, odnosno za grupiranje podataka po sličnosti i razlikama (Nebojan, 2013).

Podaci su smješteni u matricu  $X$  sa uzorcima postavljenima u redove i NIR spektrima organiziranim u stupce. Sve varijable vektora su automatski skalirane s odgovarajućom valnom duljinom i prikazane su kao:

$$X_{i,j} \leftarrow \frac{X_{i,j} - \bar{X}_j}{\sigma_j} \quad [7]$$

Skalirana matrica podataka  $X$  se aproksimira projekcijama u podprostor glavnih komponenti  $P$ :

$$T = X \cdot P \quad [8]$$

Kemometrija se intenzivno razvila zbog primjene računala u prikupljanju podataka, i u obradi i tumačenju rezultata mjerenja te podrazumijeva korištenje linearne algebre i metoda

proračuna s ciljem kvantitativnih i kvalitativnih mjerenja kemijskih podataka, prvenstveno spektara (Budić-Leto i sur., 2011). Kemometrija predstavlja obradu podataka prikupljenih mjerenjem, a to mogu biti jednostavni podaci od izračunavanja pH, mjerenja aktivnosti iona do složene interpolacije spektra Fourierovih transformacija (Kurtanjek i Gajdoš Kljusurić, 2014). To je razlog zašto se NIR spektroskopija povezuje sa kemometrijom u svrhu dobivanja maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka. Kada se istovremeno prate interakcije većeg broja varijabli, govorimo o multivarijantnom modeliranju (Wold i sur., 2001).

Iz skupa multivarijantnih analiza se izdvaja analiza glavnih komponenti (Principal Component analysis, PCA) sa prikazom doprinosa praćenih obilježja za određene uzorke i raspodjele samih uzoraka, što se koristi u ovom radu.

### *3.2.8.1. Analiza glavnih komponenti*

Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u n-dimenzijском prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu  $x_i$  ( $i= 1,2,\dots,n$ ) (Jednačak i sur., 2013). Uvođenjem glavnih komponenti (engl. Principal components, PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavljuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3...). Glavne komponente su međusobno ortogonalne (Jednačak i sur., 2013). Analiza glavnih komponenti se primjenjuje za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizičkog ili kemijskog procesa, a omogućava analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Ono što je nužno kada se radi s više varijabli jest pronaći nešto što je zajedničko svim promatranim varijablama. Geometrijski, to bi bila linija ili linije (faktorske osi) koje bi prolazile kroz centroid koji se sastoji od oblaka točaka u multidimenzionalnom prostoru. Ovo se može postići analizom glavnih komponenata. Nastaje nova serija osi (faktorskih osi), koje se nalaze u prostoru niže dimenzije, a na koju se može projicirati originalan prostor varijabli (Jednačak i sur., 2013). Vizualizacija podataka se često izvodi pomoću tzv. faktorskih ocjena (eng. scoreplots). Vrijednosti faktorskih ocjena za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih ocjena za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava njihovo grupiranje (Jednačak i sur., 2013).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U cilju utvrđivanja bioaktivnih te fizikalnih svojstva za 6 biljnih ekstrakata (Gospina trava, Kadulja, Lavanda, Majčina dušica, Melisa, Neven) i njihove međusobne povezanosti kao i veze sa blisko-infracrvenom spektroskopijom, prikazani su rezultati koji slijede.

Fizikalna svojstva prikazana su sadržajima vrijednosti za pH, vodljivost, TDS i udio suhe tvari, pri različitim eksperimentaknim uvjetima (tablice 3 i 4). Odnos vodljivosti i ukupne otopljene tvari u biljnim ekstraktima prikazan je slikom 5.

Rezultati masenih koncentracija ukupnih polifenola prikazani su slikom 6, a u tablici 5 prikazan je antioksidacijski potencijal ekstrakata, korištenjem DPPH i BR-metode, pri različitim tretmanima.

Slika 7 predstavlja srednje vrijednosti NIR spektara za svih 6 biljnih ekstrakata.

Prvi rezultat međusobne usporedbe provedenih mjerenja za različite biljne ekstrakte prikazan je analizom glavnih komponenata sa prve dvije glavne komponente (slika 8).

Različiti trendovi odnosa polifenola vs. antioksidacijski potencijal biljnih ekstrakata (DPPH i BR metoda), pri različitim uvjetima ekstrakcije (tretman 1: 40 min, 90°C, 750 o/min i tretman 2: 80 min, 60°C, 250 o/min), prikazani su slikama 9-12, uz prikaz regresijskih modela i koeficijenata determinacije.

Na samom kraju je prikaz rezultata primjene PLS regresije dobivenog primjenom NIR spektara vs. sadržaj polifenola u ekstraktima ljekovitog bilja. Tablica 6 prikazuje parametre modela u kojem je 50 % podataka služio za učenje, 50 % ili svih 100 % za predikciju. Slika 13 pokazuje usklađenost eksperimentalnih podataka (izmjenog sadržaja polifenola) te onih vrijednosti sadržaja polifenola koje su dobivene na osnovu PLS modela, na osnovu NIR spektara.

#### 4.1. REZULTATI FIZIKALNIH SVOJSTAVA EKSTRAKTA

Praćenjem fizikalnih svojstava pri različitim uvjetima ekstrakcije (tretman 1: 40 min, 90°C, 750 o/min i tretman 2: 80 min, 60°C, 250 o/min) može se pratiti utjecaj na sam biljni ekstrakt. Svojstva kao što je pH, vodljivost, TDS i udio suhe tvari prikazan je u tablicama 3 i 4.

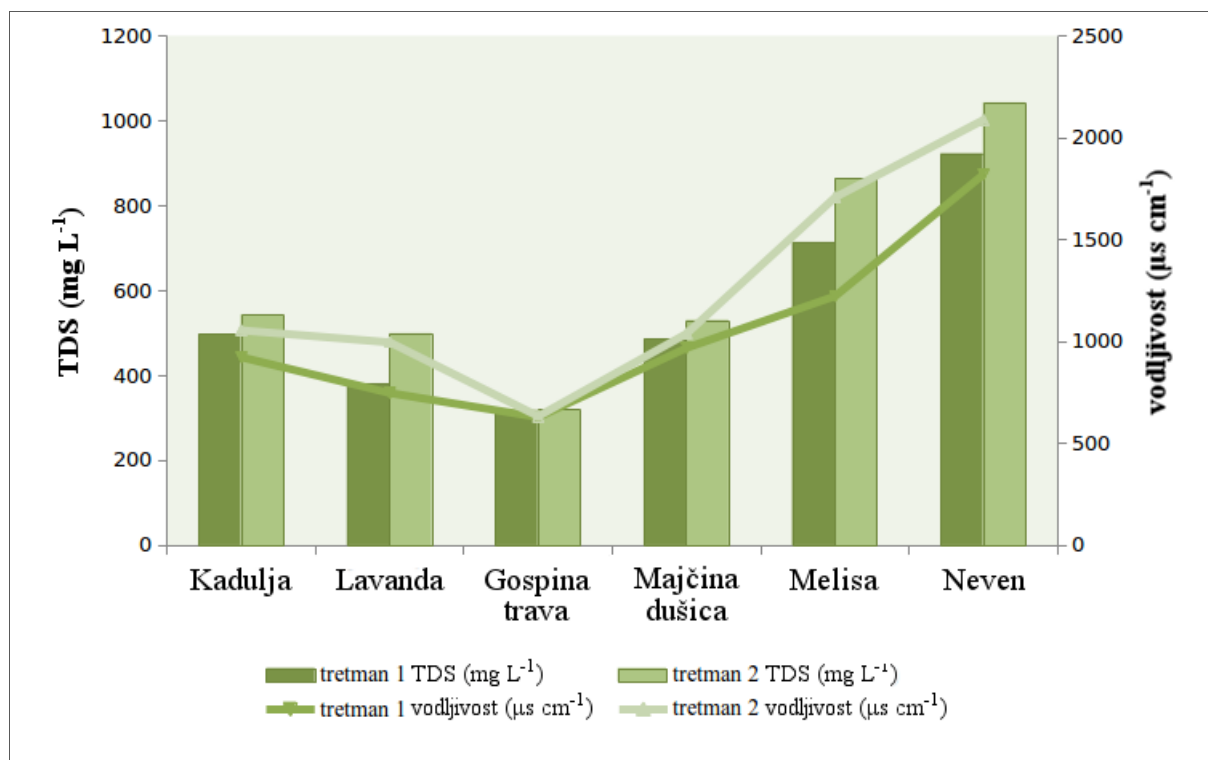
**Tablica 3.** Srednje vrijednosti za osnovne fizikalne parametre biljnih ekstrakata za tretman 1 (40°C, 90 min, 750 o/min)

Uzorak	pH	TDS (mg L <sup>-1</sup> )	vodljivost (μS cm <sup>-1</sup> )	% suhe tvari
Gospina trava	5,18	318	631	0,41
Kadulja	6,20	497	925	0,53
Lavanda	5,53	381	749	0,40
Majčina dušica	6,61	486	971	0,43
Melisa	6,38	714	1225	0,50
Neven	5,36	923	1823	0,50

**Tablica 4.** Srednje vrijednosti za osnovne fizikalne parametre biljnih ekstrakata za tretman 2 (80°C, 60 min, 250 o/min)

Uzorak	pH	TDS (mg L <sup>-1</sup> )	vodljivost (μS cm <sup>-1</sup> )	% suhe tvari
Gospina trava	5,15	319	635	0,25
Kadulja	5,85	543	1057	0,46
Lavanda	5,05	499	998	0,53
Majčina dušica	6,09	530	1041	0,49
Melisa	5,59	865	1710	0,61
Neven	5,60	1043	2090	0,72

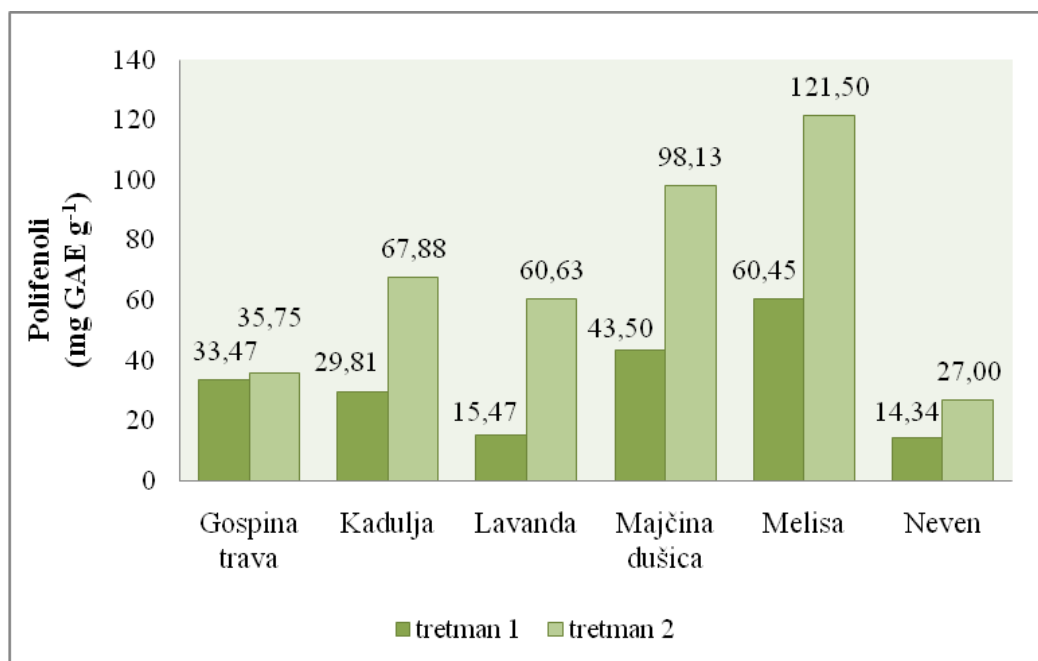
Pri višoj temperaturi te kraćem vremenu zagrijavanja i nižem broju okretaja, pH i sadržaj suhe tvari opada za gotovo sve biljne ekstrakte osim nevena.



**Slika 5.** Trend odnosa električne vodljivosti i ukupne otopljene tvari prema tretmanima

Svi ispitivani ekstrakti ljekovitog bilja pokazuju isti trend promjene električne vodljivosti i TDS-a koji s povećanjem temperature ekstrakcije rastu, međutim ekstrakt gospine trave pokazuje gotovo neznatan porast vodljivosti i TDS-a kod povišene temperature ekstrakcije. Električna vodljivost očekivano je proporcionalna izmjerenim vrijednostima TDS-a kod svih biljaka u oba tretmana, osim u slučaju ekstrakta melise iz tretmana 1 gdje na slici 5 možemo uočiti lagano odstupanje od trenda. U oba tretmana najniže vrijednosti TDS-a i vodljivosti izmjerene su za ekstrakt gospine trave a najviše za ekstrakt nevena.

## 4.2. REZULTATI MASENIH KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA



**Slika 6.** Masena koncentracija ukupnih fenola (mg GAE g<sup>-1</sup>) u vodenim ekstraktima ljekovitog bilja (oba tretmana)

Iz grafičkog prikaza masenih koncentracija *ukupnih fenola* (UF) izraženih kao mg GAE g<sup>-1</sup> za oba tretmana (slika 6) vidljivo je da su ekstrakti svih ispitanih biljaka dobiveni tretmanom 2 sadržavali veću količinu fenolnih spojeva u odnosu na ekstrakte istih biljaka dobivene u tretmanu 1. Ekstrakt nevena pokazao je najnižu koncentraciju UF u oba tretmana (14,34 mg GAE g<sup>-1</sup> za tretman 1 i 27 mg GAE g<sup>-1</sup> za tretman 2), dok je najviša koncentracija UF u oba tretmana izmjerena za ekstrakt melise (60,45 mg GAE g<sup>-1</sup> za tretman 1 i 121,50 mg GAE g<sup>-1</sup> za tretman 2). Također, može se uočiti da je najznačajnija razlika u koncentraciji UF u različitim tretmanima kod pojedinih biljaka prisutna kod ekstrakata melise i majčine dušice, dok je kod gospine trave izmjerena gotovo jednaka količina UF u oba ekstrakta.

Dent i suradnici (2013) proveli su istraživanje o utjecaju vrste otapala i uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih fenola u ekstraktu Dalmatinske kadulje. Vrijednosti koje su dobili kreću se od 13.72 do 62.78 mg GAE g<sup>-1</sup> ovisno o otapalu, vremenu ekstrakcije i temperaturi, što je u skladu sa rezultatima ovog rada. Za vodene ekstrakte izmjerene vrijednosti u ovom istraživanju su u rasponu od 48.12 do 61.68 mg GAE g<sup>-1</sup>. Rabiei i suradnici (2014) u svom su istraživanju između ostalog određivali količinu ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu



Lavande i vrijednost koju su dobili bila je 79,1 mg GAE g<sup>-1</sup>, što je neznatno viša vrijednost od sadržaja ukupnih fenola dobivenih u vodenim ekstraktima, pri tretmanu 2 (80 °C, 60 min, 250 o/min).

Mihailović Stanojević i suradnici (2013) su u svom istraživanju izmjerili udio UF u vodenom ekstraktu majčine dušice pripremanom 30 minuta u kipućoj vodi izmjerili vrijednost 2008,33 mg GAE L<sup>-1</sup>, što odgovara 40.17 mg GAE g<sup>-1</sup>. Ta vrijednost je u skladu sa dobivenim vrijednostima pri tretmanu 1 (40 °C, 90 min, 750 o/min), dok se kod tretmana 2 udvostručio sadržaj UF, što ukazuje na znatno primjerenije uvjete ekstrakcije (80 °C, 60 min, 250 o/min), ukoliko je cilj veći sadržaj UF.

#### 4.3. REZULTATI MJERENJA ANTIOKSIDACIJSKIH AKTIVNOSTI

**Tablica 5.** Izmjerene vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti DPPH i Briggs-Rauscher metodama za oba tretmana

	tretman 1		tretman 2	
	DPPH-AO (mM g <sup>-1</sup> )	B.-R.- AO (mg GAE g <sup>-1</sup> )	DPPH-AO (mM g <sup>-1</sup> )	B.-R.- AO (mg GAE g <sup>-1</sup> )
<b>Gospina trava</b>	0,2900	152,6141	0,4312	480,5077
<b>Kadulja</b>	0,2287	218,3439	0,1729	1370,8069
<b>Lavanda</b>	0,0813	320,0363	0,3017	745,2403
<b>Majčina dušica</b>	0,3125	264,4303	0,6093	1691,5987
<b>Melisa</b>	0,4446	344,5150	0,4471	1831,3690
<b>Neven</b>	0,1299	128,2865	0,4403	174,5240

Možemo primijetiti (Tablica 5) da su kod svih biljaka obje metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti pokazale više rezultate za tretman 2 (osim DPPH kadulje).

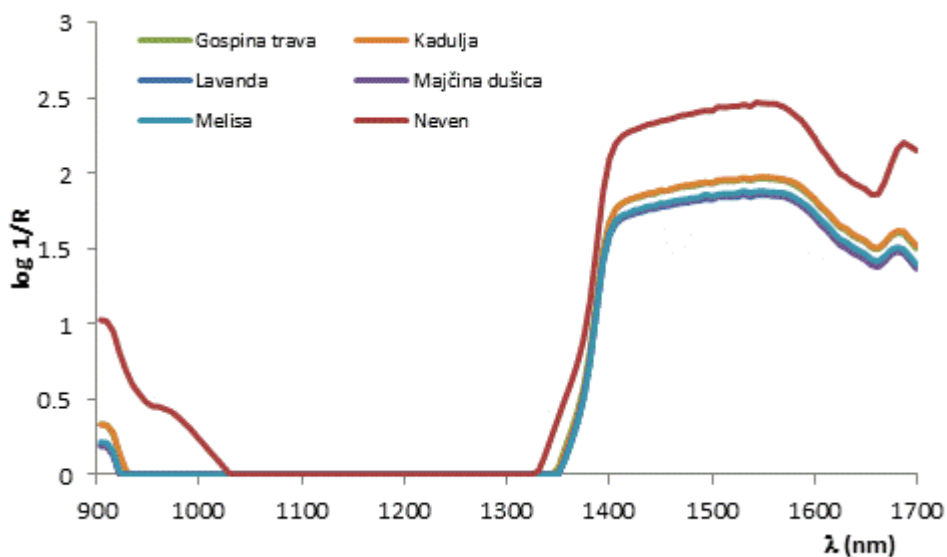
Najviša *antioksidacijska aktivnost (AOA)* izmjerena DPPH metodom u tretmanu 1 izmjerena je kod uzorka melise (0,4446 mM g<sup>-1</sup>) a najniža kod uzorka lavande (0,0813 mM g<sup>-1</sup>). Najviša

AOA izmjerena Briggs-Rauscher metodom u tretmanu 1 izmjerena je također za uzorak melise ( $344,5150 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ) a najniža za uzorak nevena ( $128,2865 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ).

U tretmanu 2, najvišu AOA mjerenu DPPH metodom pokazao je uzorak majčine dušice ( $0,6093 \text{ mM g}^{-1}$ ) a najnižu uzorak kadulje ( $0,1729 \text{ mM g}^{-1}$ ). Najvišu AOA izmjerenu Briggs-Rauscher metodom u ovom tretmanu pokazao je uzorak melise ( $1831,3690 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ) a najnižu uzorak nevena ( $174,5270 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ). Iz dobivenih rezultata mjerenja možemo uočiti da ovisno o metodi mjerenja razlikuju antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata. Obzirom da Briggs-Rauscher metoda simulira uvjete slične onima u ljudskom probavnom sustavu te na taj način daje informaciju o AOA nakon ingestije, možemo zaključiti da je melisa u odnosu na ostale ispitivane biljke, ako uspoređujemo iste uvjete ekstrakcije, najbolji izvor antioksidanasa.

#### 4.4. BLISKO-INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

NIR spektri vodenih ekstrakata 6 ljekovitih biljaka prikazani su slikom 7.



**Slika 7.** NIR spektri vodenih ekstrakata gospine trave, kadulje, lavande, majčine dušice, melise i nevena

Blisko-infracrvena spektroskopija (NIR) se koristi za praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa te brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji sudjeluju u procesu (Jednačak, 2014). Ova metoda omogućava praćenje procesa u realnom vremenu, pomoću sonde ili kivete koja je optičkim vlaknima povezana sa spektrometrom. Na grafovima (slika 7) vidljivo je da dolazi do znatnog skoka absorbancije na valnom području od 900-1000 nm i 1400-1600 nm, a sam skok završava pri valnom području od 1700 nm. Navedena valna područja govore da su u uzorcima detektirane C-H i O-H veze što govori u prilog tome da naši uzorci sadrže vodu što je razumljivo s obzirom na to kako su uzorci pripremani. Ujednačenost širine skoka, ukazuje na ujednačen sadržaj vode u uzorku te kako se sadržaj vode može pratiti NIR spektroskopijom.

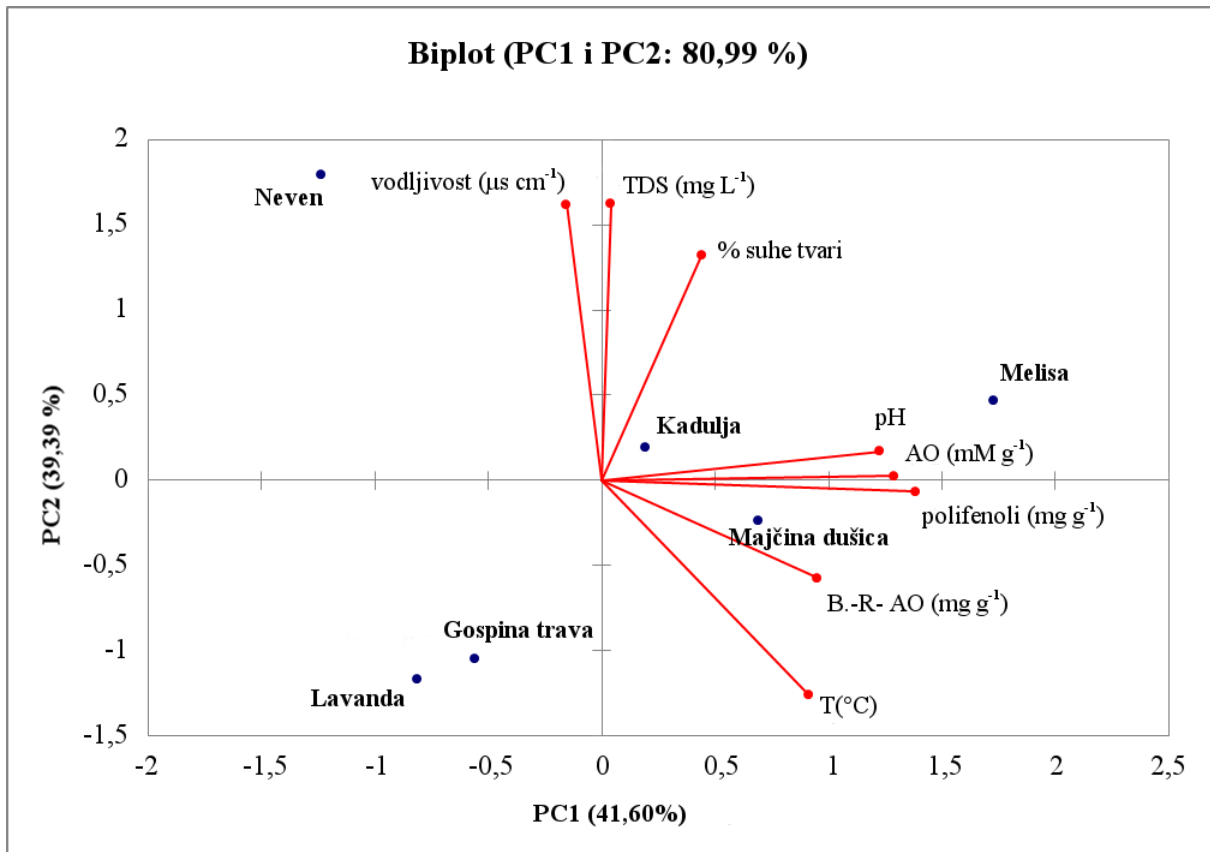
Valno područje od 1420 nm do 1600 nm prikazuje da u uzorku postoje C-H veze što nam ukazuje da u našim uzorcima ima fenola i antioksidansa (Ridley i sur., 2015).

Ono što je specifično kod vodenih ekstrakata ovih 6 ljekovitih biljaka je ravna linija spektra u području od 1050-1335 nm, što upućuje na odsutnost N-H veza, tj. proteina. Ukoliko su i prisutni, radi se o minornim sadržajima. Cilj je spektrom utvrditi koji mjereni parametri se mogu potencijalno povezati sa NIR spektrom. Uspostavljanje veze NIR spektra i nekog mjenog parametra (npr. pH) što bi značilo sljedeće: mogućnost snimanja NIR spektra te na osnovu njega – predvidjeti parametar s kojim je NIR spektar u dobroj korelaciji (npr. pH), bez dodatnih priprema uzoraka, utrošaka kemikalija i sl. (Ozaki i sur., 2007; Nicolai i sur., 2007). To bi značilo i kako se može odrediti otisak prsta za snimani ekstrakt i parametar koji se prati. Kada nije jasno koji dio spektra predstavlja "otisak prsta" te kada se pojavljuje previše razlika između spektara tada se snima i prva i/ili derivacija spektra uzorka, kako bi se utvrdio onaj dio spektra koji je specifičan za promatrani uzorak (Ozaki i sur., 2007; Nicolai i sur., 2007). NIR spektar vodenog ekstrakta nevena pokazuje odmak od spektra preostalih 5 biljaka.

#### 4.4.1. Analiza glavnih komponenti, PCA

Analizom glavnih komponenata željelo se utvrditi koji mjereni parametri koreliraju međusobno i za koje vodene ekstrakte biljaka.

PCA (eng. Principal component analysis) analiza se koristi za identifikaciju i klasifikaciju uzoraka mjerenih NIR spektroskopijom (Nebojan, 2013; Gajdoš i sur.,2015). U ovom radu PCA metoda je korištena za prikaz sličnosti i različitosti uzoraka, ovisno o mjerenim parametrima (vodljivost, TDS, udio suhe tvari, pH i temperatura te polifenoli i antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom (AO) i Briggs-Rauscher metodom (B-R-AO)). Na slici 8 se može vidjeti da je došlo do razdvajanja uzoraka biljnih vodenih ekstrakata koji su se rasporedili u sva četiri kvadranta. Vodeni ekstrakt nevena, koji se izdvojio i prema NIR spektru ima najveću vodljivost (u drugom kvadrantu), dok se ekstrakti gospine trave i lavande izdvojili u treći kvadrant što je pokazatelj najnižih sadržaja svih mjerenih parametara iznad osi x, a to su vodljivost, TDS, udio suhe tvari i pH.

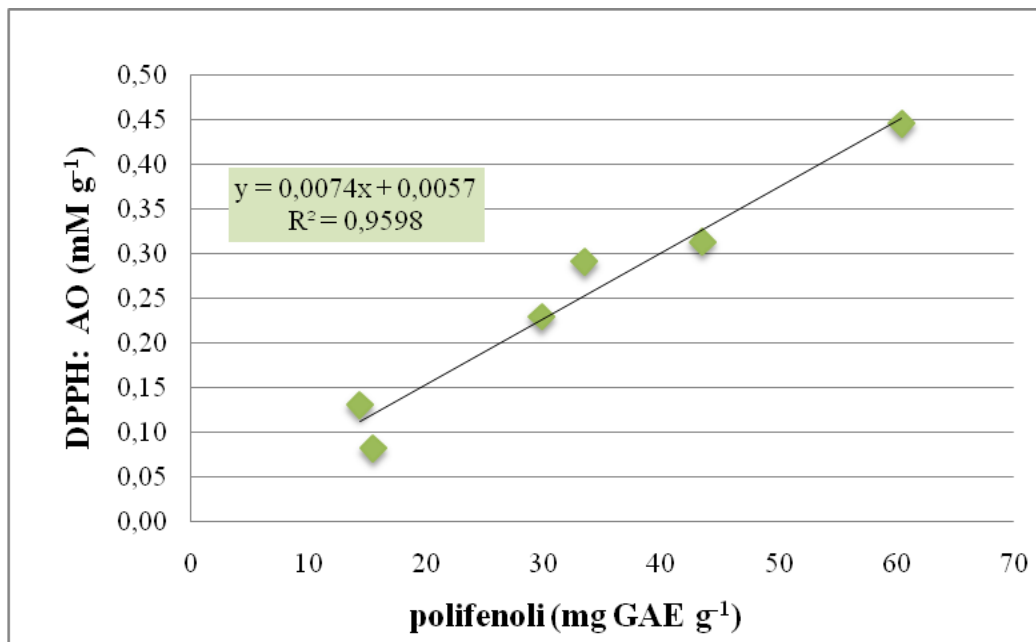


**Slika 8.** PCA analiza za vodene ekstrakte 6 biljaka i sedam praćenih parametara

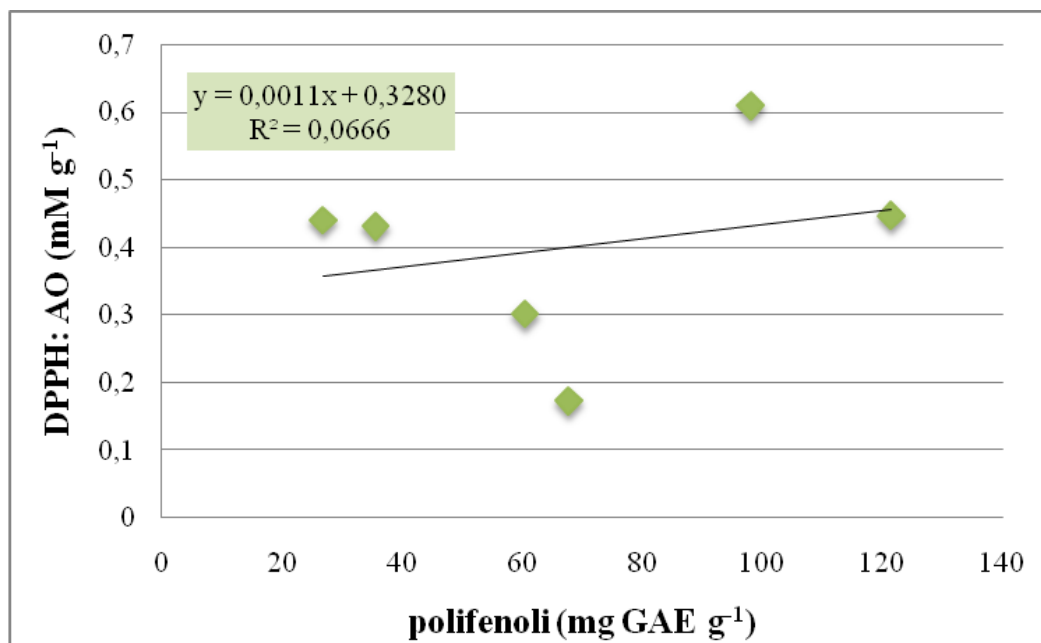
Navedeno ukazuje na mogućnosti primjene NIR spektroskopije u identifikaciji uzorka što je u skladu sa navodima drugih istraživanja (Gajdoš Kljusurić i sur., 2015; Budić-Leto i sur., 2011). Primjenom PCA analize možemo odrediti koji od parametara imaju značajan utjecaj na raspodjelu uzoraka te na osnovu dobivenih podataka u prvoj glavnoj komponenti, koja objašnjava 41,6 % svih interakcija u promatranom skupu podataka, glavni utjecaj pripada

sadržaju ukupnih fenola te antioksidacijskim aktivnostima određenih dvjema metodama DPPH i BR metoda). Druga glavna komponenta doprinosi sa 39,39 % pojašnjenju varijanci u promatranom skupu podataka, a tu dominira vrijednost vodljivosti, TDS-a i udjela suhe tvari. Ukupno se može pojasniti preko 80 % varijance u promatranom skupu podataka ( $PC1+PC2=80,99$  %). Kako su ukupni fenoli pokazali visok utjecaj u prvoj glavnoj komponenti – upravo je njihov sadržaj koreliran sa NIR spektrima kako bi se na osnovu NIR spektra, mogla predvidjeti koncentracija ukupnih polifenola u nekom vodenom ekstraktu nevena, gospine trave, kadulje, lavande, majčine dušice, melise i/ili nevena.

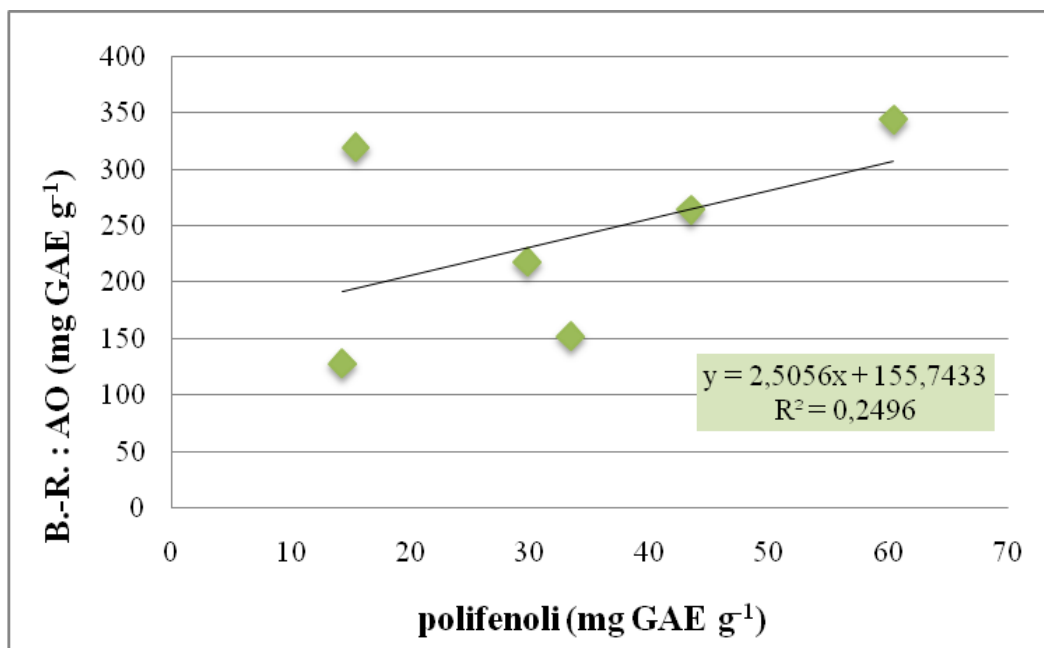
#### 4.5. REGRESIJSKI MODELI ODNOSA PROMATRANIH PARAMETARA



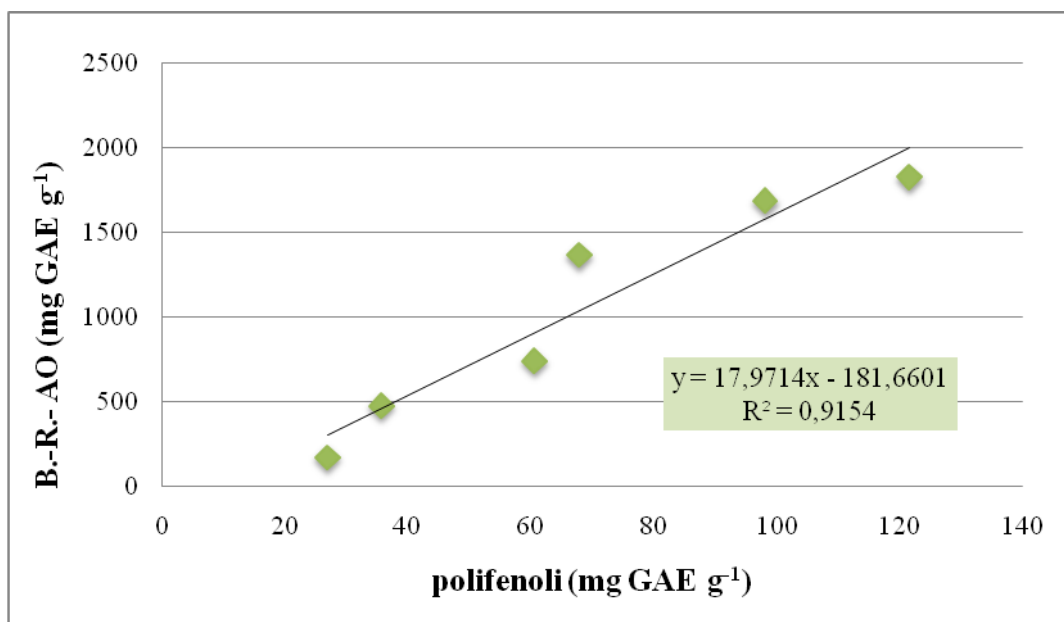
Slika 9. Ovisnost ukupnog antioksidacijskog kapaciteta mjenenog DPPH metodom o udjelu polifenola (tretman 1)



Slika 10. Ovisnost ukupnog antioksidacijskog kapaciteta mjenenog DPPH metodom o udjelu polifenola (tretman 2)



**Slika 11.** Ovisnost antioksidacijske aktivnosti mjerene Briggs-Raucher metodom o udjelu polifenola (tretman 1)



**Slika 12.** Ovisnost antioksidacijske aktivnosti mjerene Briggs-Raucher metodom o udjelu polifenola (tretman 2)

Kod tretmana 1 (slika 9) vidljiva je čvrsta veza ( $R^2=0,96$ ) između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom, dok je u slučaju tretmana 2 (slika 10) koeficijentom determinacije ( $R^2= 0,07$ ) utvrđena slaba veza između ovih parametara. S druge

strane, na slikama 11 i 12 vidimo da mjerenje antioksidacijske aktivnosti drugom metodom, odnosno metodom po Briggs-Rauscher-u, pokazuje drugačiju međuzavisnost ispitivanih parametara, odnosno kod tretmana 1 ispostavila se slaba veza između antioksidacijske aktivnosti i ukupnih polifenola dok je kod tretmana 2 ta veza čvrsta. Antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom kod ekstrakta dobivenih pri nižoj temperaturi ekstrakcije proporcionalna je koncentraciji ukupnih polifenola dok se ta proporcionalnost gubi kod povišene temperature ekstrakcije. U slučaju mjerenja AOA Briggs-Rauscher metodom čvrsta veza se ustanovila kod uzoraka ekstrahiranih pri višoj temperaturi, što ukazuje da promjena pH ima različit utjecaj na antioksidacijsku aktivnost od temperature ekstrakcije.

Istraživanje koje su proveli Fu i suradnici (2011) na 51 vrsti hladnih biljnih čajeva pokazalo je čvrstu povezanosti antioksidacijske aktivnosti i ukupnih polifenola ( $R^2=0.80$ ) što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom eksperimentu pri tretmanu 1, međutim, njihovo istraživanje provedeno je na komercijalnim pripravcima čajeva pa nije navedena temperatura same ekstrakcije.

Vergara Salinas i suradnici (2012) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj uvjeta ekstrakcije na sadržaj polifenola i antioksidacijsku aktivnost u čaju timijana i ustanovili su da postoji negativna korelacija između antioksidacijske aktivnosti i udjela i raznolikosti polifenola dobivenih kod viših temperatura sugerirajući da kod povišenih temperatura ekstrakcije iz biljnog materijala dolazi do formiranja nafenolnih antioksidativnih vrsta (npr. produkti Millardove reakcije- melanoidi) te isto tako da dolazi do degradacije fenolnih spojeva u njihove derivate koji imaju različitu antioksidacijsku aktivnost od polifenola od kojih potječu. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da samo mjerenje udjela ukupnih polifenola nije nužno dobar prediktor antioksidacijske aktivnosti, već da ona ovisi o ukupnom sadržaju i svojstvima svih antioksidativnih vrsta u uzorku ali i o metodi mjerenja.



#### 4.6. PARCIJALNI LINEARNI REGRESIJSKI MODELI ODNOSA NIR SPEKTARA I UKUPNIH POLIFENOLA

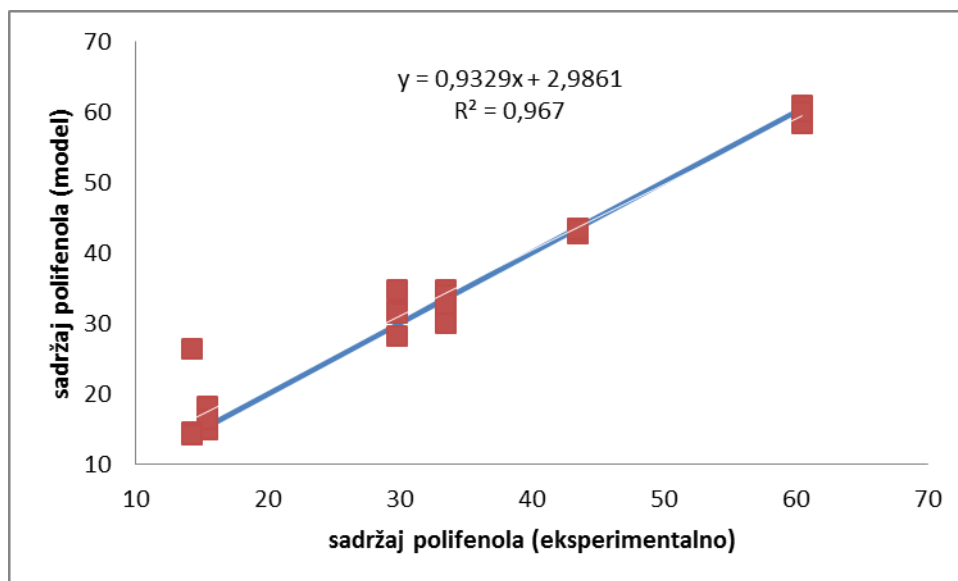
PLS modeli

Parcijalna linearna regresija predstavlja model u kojem su ulazne varijable valne duljine NIR spektara, a izlaznu veličinu predstavlja sadržaj ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima promatranog ljekovitog bilja.

**Tablica 6.** Parametri PLS modela

		<b>nagib</b>	<b>odsječak</b>	<b>RMSE</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>validacija</b>	učenje	0,997	0,888	2,055	0,997
<b>predikcija</b>	test	0,959	1,685	5,537	0,886
	sve	0,9781	0,887	3,959	0,940

Parametri PLS modela pokazuju kako je skup uzoraka izabran za validaciju bio primjeren (nizak RMSE i visok koeficijent determinacije,  $R^2$ ): Međutim u skupu podataka korištenih za testiranje (test) je očito bilo onih podataka koji su odstupali od prosjeka te je RMSE znatno viši, a koeficijent determinacije niži ( $R^2=0,886$ ). Kada se predikcijski PLS model koristi u predikciji vrijednosti ukupnih polifenola za sve promatrane uzorke-vidljivo je vrlo dobro slaganje eksperimentalnih podataka i onih dobivenih modelom (Slika 13).



**Slika 13.** PLS model za ukupne polfenole

Regresijski model predviđa da će se referentne vrijednosti analize (koncentracija polifenola) ravnomjerno rasporediti. Ovaj model može se primijeniti za predikciju drugih ekstrakata ljekovitog bilja od gospine trave, kadulje, lavande, majčine dušice, melise i nevena čiji je očekivani sadržaj ukupnih polifenola od 10 do 79 mg g<sup>-1</sup>. Prema visokom koeficijentu determinacije ( $R^2=0,967$ ) ovo je odličan predikcijski model te se može koristiti i za kvantifikaciju sadržaja ukupnih polifenola.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Gotovo svi ispitivani ekstrakti ljekovitog bilja (osim Nevena) pokazuju isti trend promjene električne vodljivosti i TDS-a koji s povećanjem temperature ekstrakcije rastu.
2. Svi biljni ekstrakti dobiveni tretmanom 2 sadržavali su veću količinu UF u odnosu na ekstrakte istih biljaka dobivenih tretmanom 1 iz čega proizlazi da su uvjeti ekstrakcije iz tretmana 2 ( $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60\text{ min}$  pri  $250\text{ o/min}$ ) pogodniji za dobivanje ekstrakata bogatih polifenolima. Ekstrakt Nevena pokazao je najnižu koncentraciju UF u oba tretmana dok je najviša koncentracija UF u oba tretmana izmjerena za ekstrakt Melise.
3. Antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata razlikuju ovisno o metodi mjerenja. Obzirom da je najviša AOA izmjerena Briggs-Rauscher metodom izmjerena kod ekstrakta Melise (kod oba tretmana), možemo zaključiti da je, u odnosu na ostale biljke, ekstrakt melise najbolji izvor antioksidanasa.
4. Linearni modeli povezanosti koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijskih aktivnosti svih uzoraka samoniklog bilja i oba tretmana ekstrakcije ukazuju na čvrstu vezu ( $R^2=0,96$ ) između sadržaja UF i AOA izmjerene DPPH metodom za ekstrakte dobivene tretmanom 1, ali slabu vezu ( $R^2= 0,07$ ) za iste parametre ekstrakata dobivenih tretmanom 2. S druge strane, čvrsta veza ( $R^2=0,92$ ) između UF i AOA izmjerenih Briggs-Rauscher metodom ispostavila se za uzorke dobivene tretmanom 2, dok je kod tretmana 1 ta veza slaba ( $R^2=0,25$ ). Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da samo mjerenje udjela ukupnih polifenola nije nužno dobar prediktor antioksidacijske aktivnosti, već da ona ovisi o ukupnom sadržaju i svojstvima svih antioksidativnih vrsta u uzorku ali i o metodi mjerenja.
5. Obradom podataka NIR spektroskopske analize i primjenom PLS modela dobiven je regresijski model ulaznih varijabli valnih duljina NIR spektra s ciljem predikcije sadržaja ukupnih polifenola s visokim koeficijentom determinacije ( $R^2=0,97$ ) zbog čega se NIR spektroskopija pokazala kao potencijalno vrlo uspješna metoda u predikciji sadržaja ukupnih polifenola biljnih ekstrakata. Primjena NIR spektroskopije pokazala je time brojne prednosti nad klasičnim metodama poput smanjenog utroška uzoraka, kemikalija i vremena potrebnog za analizu.

## 6. LITERATURA

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **85** (5), 957–998.

Barabácssy, S. (2001) The application of near infrared spectroscopy (NIR) technique for non-destructive investigation of mixed milk powder products. *Mljekarstvo.* **51**, 263-272.

Barnes, J., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. (2001) St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol.* **53**(5), 583-600.

Bauder, J., Sigler, W. A. (2015) TDS Facts sheet. <[https://web.archive.org/web/20150429145631/http://waterquality.montana.edu/docs/homeowners/tds\\_fact\\_sheet.shtml](https://web.archive.org/web/20150429145631/http://waterquality.montana.edu/docs/homeowners/tds_fact_sheet.shtml)> pristupljeno 25. srpnja 2016.

Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Determination of total polyphenol content in food with the flow-injection method. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **59** (3), 205–212.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.

Bruckner, M. Z. (2016) Water and soil characterization - pH and electrical conductivity.<[http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/environ\\_sampling/pH\\_EC.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/environ_sampling/pH_EC.html)> Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Budić-Leto, I., Gajdoš Kljusurić, J., Zdunić, G., Tomić-Potrebuješ, I., Banović, M., Kurtanjek, Ž., Lovrić, T. (2011) Usefulness of near infrared spectroscopy and chemometrics in screening of the quality of dessert wine Prošek. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 9-15.

Butnariu, M., Zepa Coransi, C. (2012) Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chem. Cent. J.* **6**, 35.

Capek, P., Hřibalova, V., (2004) Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry.* **65**, 1983-1992.

Carnat, A. P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J. L. (1998) The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm. Acta. Helv.* **72**, 301-305.

Cayuela Sánchez, J.A. (2012) Using NIR spectroscopy to predict postharvest quality. *CAB Reviewers.* **7**, 1-14.

Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M. C., Speroni, E. (2002) Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7504-7509

Čančarević, A., Bugarski, B., Šavikin, K., Zdunić, G. (2013) Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korišćenje u etnomedicini. *Lek. Sirov.* **33**, 3-17.

Dadić, Ž. (2012) Priručnik o temeljnoj kvaoci vode u Hrvatskoj. <[http://www.waterline.hr/Prirucnik\\_za\\_vodu.pdf](http://www.waterline.hr/Prirucnik_za_vodu.pdf)>Pristupljeno 26. srpnja 2016.

Dent, M., Dragović Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild Sage (*Sage officinalis* L.) extracts. *Food. Technol. Biotech.* **51(1)**, 84-91.

Fijačko, M. (2013) Farmakološki antioksidansi. Diplomski rad. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb

Firšt Godek, L., Godek, J., Milas, K., Krznarić, K. (2003) Profitabilnost proizvodnje matičnjaka (*Mellisa officinalis* L.) i nevena (*Calendula officinalis* L.) na obiteljskom gospodarstvu. *Agron. Glas.* **65**, 15-12.

Fu, L., Xu, B.T., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xu, X.R., Xia, E.Q., Li, H.B. (2011) Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *Int. J. Mol. Sci.* **12(4)**, 2112-2124.

Fürst, P. (2009) Basic in clinical nutrition :Role of antioxidants in nutritional support. e-SPEN. 4, e105-e107.

Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M., Bauman, I. (2015) Classification and processing optimization of barley milk production using NIR spectroscopy, particle size, and total dissolved solids analysis. *J. Chem.* **201(5)**, 1-7.

Gajdoš Kljusurić, J., Djaković, S., Kruhak, I., Kovačević Ganić, K., Komes, D., Kurtanjek, Ž. (2005) Application of Briggs-Rauscher reaction for measurement of antioxidant capacity of Croatian wines. *Acta Aliment.* **34(4)**, 483-492.

Gonçalves, S., Romano, A. (2013) In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Adv.* **31(2)**, 166-174.

Halberstein, R. A. (2005) Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Ann. Epidemiol.* **15**, 686–699.

Hernández Gómez A, He Y., García Pereira A. (2006) Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* **77**, 313–319.

Hollman, P. (2001) Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. *J. Sci. Food Agr.* **81(9)**, 842-852.

Huang, H., Yu H., Xu, H., Ying, Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *J. Food Eng.*, **87**, 303–313.

Hunt, E. J., Lester, E. A., Tackett, R. L. (2001) Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sci.* **62(2)**, 181-190.

Jednačak, T., Novak P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62**, 71-80.

Jerković, I., Radonić, A. (2009) Praktikum iz organske kemije. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split.

Kaushik, R., Pradeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci. i Tehc.* **47**, 27-33.

Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., Mihailov, A. (2010) Evaluation of antioxidant activity of medical plants containing polyphenols compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochim. Pol.* **57(2)**, 229-234.

Kurtanjek, Ž., Gajdoš Kljusurić, J. (2014) Statistical modelling of anthropometric characteristics evaluated on nutritional status. U *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (ur. Granato, D. i Ares, G.) John Wiley and Sons, Oxford, UK. str. 285 – 302.

Lattanzio, V. (2013) Phenolic Compounds: Introduction In book: *Natural products*, Chapter: 50. Phenolic Compounds: Introduction, Publisher: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Editors: K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon, str.1543-1580.

Liu, Y., Sun, X., Ouyang, A. (2010) Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible–NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**, 602–607.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* **4(8)**, 118-126.

Martinić, M. (2011) Ljekovita svojstva biljaka: Gospina trava. <<http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8314>>. pristupljeno 26. lipnja 2016.

Mihailović Stanojević, N., Belščak Cvitanović, A., Grujić Milanović, J., Ivanov, M., Jovović, Dj., Bugarski, D., Miloradović, Z. (2013) Antioxidant and antihypertensive activity of extract from *Thymus serpyllum* L. in experimental hypertension. *Plant Foods Hum Nutr.* **68(3)**, 235-240.

Naczk, M., Shahidi, F. (2006) Phenolic in cereal, fruits and vegetables: Occurrence extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523-1542.

Nebojan, I. (2013) Primjena blisko-infracrvene spektroskopije u praćenju kakvoće bobičastog voća. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Nicolai B. M, Beullens K., Bobelyn E., Peirs A., Saeys W., Theron K. I., Lammertyn J. (2007) Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol. Tec.* **46**, 99-118.

Ozaki Y., McClure W. F., Christy A. A. (2007) Near-infrared spectroscopy in Food *Science and Technology*. John Wiley & Sons, New Jersey.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Current Understanding of Dietary Polyphenols and their Role in Health and Disease. *Curr. Nutr. Food Sci.* **5(4)**, 249-263.

Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. (2005). A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol, and grape extract cases. *Eur. Food Res. Technol.* **221(3-4)**, 284-290.

Rabiei, Z., Rafieian-Kopaei, M., Mokhtari, S., Shahrani, M. (2014) Effect of dietary ethanolic extract of *Lavandula officinalis* on serum lipids profile in rats. *Iran J Pharm. Res.* **13(4)**, 1295-1301.



Ridley, E., Gantner, D., Pellegrino, V (2015) Nutrition therapy in critically ill patients- a review of current evidence for clinicians. *Clin. Nutr.* **34**, 565-571.

Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferriera, M. (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* **162**, 981-987.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130(8)**, 2073S-2085S.

Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., Dias, A. C. P. (2005) Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. *Food Chem.* **90(1-2)**, 157-167.

Veeru, P., Pankaj Kishor, M., Meenakshi, M. (2009) Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *J. Med. Plants Res.* **3 (8)**, 608-612.

Vergara Salinas, J.R., Pérez Jiménez, J., Torres J. L., Agosin, E., Pérez Correa, J. R. (2012) Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* **60(44)**, 10920-10929.

Williams A.A., Rogerst C.A., Collins A.J. (1988) Relating chemical/physical and sensory data in food acceptance studies. *Food Qual. Prefer.* **1**, 25-31.

Wold, S., Sjöstrom, M., Eriksson, L. (2001) PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab. Systems.* **58**, 109–130.

Zakon o hrani (2014) *Narodne novine* **14**, Zagreb.

Živković, R. (2000) *Hranom do zdravlja*. Medicinska naklada. Zagreb.

Žutić, I. (2007) *Lavandin, kadulja i komorač u kontinentalnom području*. Agronomski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

## 7. PRILOZI

**Prilog 1.** Izmjena boja pri BR reakciji i oscilacijske izmjene pri promjeni boja

