

Utjecaj metode ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih spojeva stolisnika (*Achillea millefolium* L.)

Novosel, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:506434>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ METODE EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ
BIOAKTIVNIH SPOJEVA STOLISNIKA
(*Achillea millefolium* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Anamarija Novosel

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

**UTJECAJ METODE EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ
BIOAKTIVNIH SPOJEVA STOLISNIKA
(*Achillea millefolium* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Anamarija Novosel

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Martina Grdiša

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Anamarija Novosel**, JMBAG 0178121579, rođena 25. 04. 2000. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ METODE EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA STOLISNIKA
(*Achillea millefolium* L.)**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Anamarije Novosel**, JMBAG 0178121579, naslova

UTJECAJ METODE EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA STOLISNIKA
(*Achillea millefolium* L.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Grdiša, mentor

2. izv. prof. dr. sc. Jana Šic Žlabur, član

3. dr. sc. Filip Varga, član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj izvanrednoj mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Grdiša na svoj uloženoj pomoć, vremenu i trudu kao i na pozitivnoj energiji koju mi je pružila prilikom pisanja ovoga rada. Također velika joj hvala na svom prenesenom znanju i stvaranju još veće ljubavi prema agronomskoj struci.

Velika hvala mojoj obitelji i prijateljima na njihovoj podršci i pomoći koju su mi uvijek nesebično pružali.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Stolisnik (<i>Achillea millefolium</i> L.)	3
2.1.1. Sistematika i rasprostranjenost	3
2.1.2. Morfološka svojstva	4
2.1.3. Kemijska svojstva	6
2.1.4. Povijest upotrebe, tradicionalna primjena i ljekovita svojstva	8
2.1. Metode ekstrakcije	11
2.1.1. Maceracija	11
2.1.2. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija	11
2.1.3. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	12
3. Materijali i metode	13
3.1. Biljni materijal	13
3.2. Maceracija	14
3.3. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija	14
3.4. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija	15
3.5. Analiza bioaktivnih spojeva ekstrakata i praha stolisnika	16
3.5.1. Određivanje sadržaja vitamina C	16
3.5.2. Određivanje ukupnih polifenola	19
3.5.3. Određivanje flavonoida i neflavonoida	22
3.5.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	25
3.5.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	27
3.6. Određivanje boje ekstrakata stolisnika	29
3.7. Statistička obrada podataka	29
4. Rezultati i rasprava	30

4.2. Sadržaj vitamina C	30
4.2. Sadržaj ukupnih polifenola.....	31
4.3. Sadržaj flavonoida i neflavonoida.....	34
4.4. Antioksidacijski kapacitet (ABTS metoda).....	37
4.5. Antioksidacijski kapacitet (FRAP metoda).....	38
4.6. Boja ekstrakata stolisnika	40
4.7. Analiza praha stolisnika.....	45
5. Zaključak.....	46
6. Popis literature	47
Životopis	55

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Anamarije Novosel**, naslova

UTJECAJ METODE EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA STOLISNIKA (*Achillea millefolium* L.)

Stolisnik (*Achillea millefolium* L.) i njegovi pripravci (npr. ekstrakti) posjeduju široki spektar djelovanja koji se pripisuje bogatom sadržaju brojnih bioaktivnih spojeva i eteričnog ulja. Na sadržaj bioaktivnih spojeva ekstrakta utječu brojni čimbenici, a prvenstveno metoda ekstrakcije. U ovome radu prikupljeni biljni materijal podvrgnut je trima metodama ekstrakcije (maceracija, mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija), a dobiveni ekstrakti analizirani su na sadržaj bioaktivnih spojeva te je utvrđen i njihov antioksidacijski kapacitet. Najveći sadržaj vitamina C (10,60 mg/100 g svježe tvari), ukupnih polifenola (495,29 mg GAE/100 g svježe tvari), flavonoida (271,95 mg GAE/100 g svježe tvari) i antioksidacijski kapacitet (FRAP metoda: 3994,41 $\mu\text{mol TE/L}$) zabilježen je kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, dok je najveći sadržaj neflavonoida (224,68 mg GAE/100 g svježe tvari) zabilježen kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, polifenoli, flavonoidi, mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija

Summary

Of the master's thesis – student **Anamarija Novosel**, entitled

UTJECAJ METODE EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA STOLISNIKA (*Achillea millefolium* L.)

Yarrow (*Achillea millefolium* L.) and its medicinal preparations (e.g. extracts) have a broad spectrum of activity, which is attributed to the content of numerous bioactive compounds and essential oil. The content of the extract itself is influenced by numerous factors, as well as by the extraction method. In this work, the sampled plant material was subjected to three extraction methods (maceration, microwave-assisted extraction, ultrasound-assisted extraction), and the obtained extracts were analyzed for the content of bioactive compounds and their antioxidant capacity was determined. The highest content of vitamin C (10.60 mg/100 g dw), total polyphenols (495.29 mg GAE/100 g dw), flavonoids (271.95 mg GAE/100 g dw) and antioxidant capacity (FRAP method: 3994.41 $\mu\text{mol TE/L}$) was found in the ultrasound assisted extraction for 10 minutes, while the highest content of non-flavonoids (224.68 mg GAE/100 g dw) was recorded during microwave assisted extraction for 10 minutes.

Keywords: antioxidant capacity, polyphenols, flavonoids, microwave-assisted extraction, ultrasound-assisted extraction

1. Uvod

Stolisnik (*Achillea millefolium* L.) je zeljasta višegodišnja biljna vrsta koja pripada porodici Asteraceae i rodu *Achillea* (Applequist i Moerman, 2011). Autohtona je vrsta Europe, Azije, Sjeverne i Središnje Amerike (Vélez-Gavilán, 2016), a samoniklo raste i na području Republike Hrvatske. Zahvaljujući svojoj adaptabilnosti, stolisnik, uspijeva u gotovo svim klimatskim pojasevima, kao i tipovima tla te zbog toga čini sastavnicu flore gotovo svakog stanišnog tipa na području Europe pa tako i Republike Hrvatske (Vélez-Gavilán, 2016).

Stolisnik je karakterističnog mirisa i specifičnog gorkog okusa (Mollasalehi i sur., 2013; Gorni i sur., 2021). U prosjeku doseže visinu od 20 do 90 cm (Mollasalehi i sur., 2013), ima uspravnu zelenu stabljiku, zelene lancetaste listove koji su dvostruko ili trostruko perasto razdijeljeni, gronju kao tip sastavljenog cvata, koja se sastoji od brojnih, malih bijelih glavica koji se sastoje od cjevastih i jezičastih cvjetova te sustav podanaka kojim se vegetativno razmnožava (Hulina, 1998). Cvatnja stolisnika odvija se u periodu od svibnja pa sve do rujna (Mollasalehi i sur., 2013; Ali i sur., 2017), a plod je sjajna roška veličine 2 mm bez papusa (Akram, 2013).

Stolisnik je jedna od najpoznatijih ljekovitih biljnih vrsta, čija upotreba je stara gotovo koliko i samo čovječanstvo (Leroi, 1975; Solecki, 1975). Kao biljna droga koristi se svježi ili sušen nadzemni dio (herba) od kojeg se pripremaju ekstrakti, poput uvaraka i tinktura (Gorni i sur., 2021). Ima brojna djelovanja, poput antimikrobnog, adstringentnog i protuupalnog (Yassa i sur., 2007; Villalva i sur., 2019), a najčešće se upotrebljava za liječenje probavnih i menstrualnih tegoba te za zaustavljanje vanjskih i unutarnjih krvarenja.

Iznimna ljekovitost i široki spektar djelovanja, ove vrste, pripisuju se njezinom kemijskom sastavu, čije sastavnice su brojni bioaktivni spojevi, poput polifenola i flavonoida, i eterično ulje bogato monoterpenima i seskviterpenima (Villalva i sur., 2022).

Kemijski sastav stolisnika, kao i njegovih ekstrakata, može varirati. Na to utječu brojni čimbenici (Farasati Far i sur., 2023), ali i metoda ekstrakcije. Zato je pri ekstrakciji vrlo važan izbor metode ekstrakcije i njezina optimizacija, kako bi dobiveni ekstrakt sadržavao što veći udio sastavnica čije djelovanje je blagotvorno i ljekovito za čovjeka.

Pri izboru metode ekstrakcije, također valja uzeti u obzir njezin utjecaj na okoliš, odnosno odabrana metoda treba biti ekološki prihvatljiva. Primjeri takvih metoda su maceracija, mikrovalna ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija koje karakterizira visoka energetska učinkovitost, neinvazivnost, brzina, jednostavnost, upotreba otapala koja nisu štetna za okoliš kao i mogućnost ekstrakcije termolabilnih spojeva (Eskilsson i Björklund, 2000; Fu i sur., 2006; Uysal i sur., 2019; Vázquez-Sánchez i sur., 2019; Alcántara i sur., 2020).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je usporediti utjecaj različitih postupaka ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta stolisnika.

2. Pregled literature

2.1. Stolisnik (*Achillea millefolium* L.)

2.1.1. Sistematika i rasprostranjenost

Achillea millefolium L. (eng. yarrow; hrv. obični stolisnik, hajdučka trava) višegodišnja je vrsta koja pripada porodici Asteraceae (glavočike) i rodu *Achillea* L.. Rod *Achillea* obuhvaća oko 100 do 140 vrsta koje su najvećim djelom autohtone za područje Euroazije, a manjim djelom za Sjevernu Ameriku i Afriku (Anne i sur., 2006; Vélez-Gavilán, 2016). Na području Europe prisutno je 58 vrsta koje pripadaju rodu *Achillea* (Flora Europaea, 2024), dok su na području Republike Hrvatske prisutne 23 vrste (Tablica 2.1.1.1.).

Tablica 2.1.1.1. Vrste roda *Achillea* koje su prisutne na području Republike Hrvatske

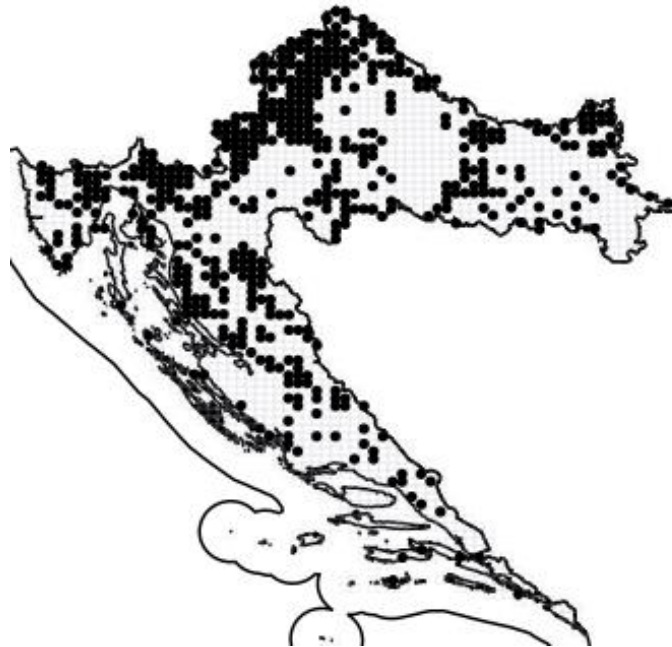
Latinski naziv	Hrvatski naziv
<i>Achillea abrotanoides</i> (Vis.) Vis.	Planinski stolisnik
<i>Achillea ageratum</i> L.	Trajni stolisnik
<i>Achillea aspleniifolia</i> Vent.	Papratni stolisnik
<i>Achillea clavennae</i> L.	Bijeli stolisnik
<i>Achillea coarctata</i> Poir.	Skupljeni stolisnik
<i>Achillea collina</i> (Wirtg.) Heimerl	Brežuljkavi stolisnik
<i>Achillea crithmifolia</i> Waldst. et Kit.	Motrikolistni stolisnik
<i>Achillea distans</i> Willd.	Okrijljeni stolisnik
<i>Achillea distans</i> Willd. ssp. <i>distans</i>	Vunasti jezičac
<i>Achillea distans</i> Willd. ssp. <i>tanacetifolia</i> (Fiori) Janch.	Vratičolistni jezičac
<i>Achillea ligustica</i> All.	Ligurski stolisnik
<i>Achillea millefolium</i> L.	Obični stolisnik
<i>Achillea millefolium</i> L. ssp. <i>millefolium</i>	-
<i>Achillea nobilis</i> L.	Plemeniti stolisnik
<i>Achillea nobilis</i> L. ssp. <i>neilreichii</i> (A. Kern.) Velen.	Žutičasti jezičac
<i>Achillea nobilis</i> L. ssp. <i>nobilis</i>	-
<i>Achillea odorata</i> L.	Mirišljavi stolisnik
<i>Achillea pannonica</i> Scheele	Panonski stolisnik
<i>Achillea pratensis</i> Saukel et Länger	Livadni stolisnik
<i>Achillea ptarmica</i> L.	Močvarni stolisnik
<i>Achillea setacea</i> Waldst. et Kit.	Bodljasti stolisnik
<i>Achillea tomentosa</i> L.	Pustenasti stolisnik
<i>Achillea virescens</i> (Fenzl) Heimerl	Zelenkasti stolisnik

Izvor: Nikolić, 2024.

Vrsta *A. millefolium* autohtona je za područje Europe, Azije te Sjeverne i Središnje Amerike, a danas je namjerno (u svrhe uzgoja ili kao ukrasna biljka) ili nenamjerno unesena na područje Butana, Kine, Japana, Australije, Afrike i Južne Amerike (Vélez-Gavilán, 2016).

Na području Europe rasprostranjene su tri podvrste vrste *A. millefolium*: subsp. *millefolium* (mali bijeli cvjetovi; najrasprostranjenija podvrsta), subsp. *alpestris* (cvjetovi ružičaste boje) i subsp. *ceretanum* (veći bijeli cvjetovi; rasprostranjena samo na području Španjolske i Francuske) (Applequist i Moerman, 2011), dok je na području Republike Hrvatske prisutna samo subsp. *millefolium* (Nikolić, 2024).

Stolisnik je vrlo adaptabilna vrsta te uspijeva na gotovo svim tipovima tala kao i u svim klimatskim pojasevima (Vélez-Gavilán, 2016), zbog čega jest sastavnica flore gotovo svakog stanišnog tipa na području Europe pa tako i Republike Hrvatske (Slika 2.1.1.1.).



Slika 2.1.1.1. Rasprostranjenost stolisnika na području Republike Hrvatske
Izvor: Nikolić, 2024.

2.1.2. Morfološka svojstva

Stolisnik je višegodišnja zeljasta biljna vrsta goraka okusa i karakteristična mirisa (Mollasalehi i sur., 2013; Gorni i sur., 2021) (Slika 2.1.2.1.). U prosjeku doseže visinu od 20 do 90 cm u ovisnosti o okolišnim čimbenicima u kojima se razvijala (Mollasalehi i sur., 2013).



Slika 2.1.2.1. Stolisnik (*Achillea millefolium* L.)

Autor: Novosel A., 2024.

Ima vrlo plitki sustav podanaka koji rastu vodoravno. Podanci po sebi sadrže brojne pupove iz kojih izrastaju novi izdanci (Hulina, 1998). Stabljika je zelena, uspravna, razgranata i prekrivena je dlačicama. Listovi su zeleni, 5 do 20 cm dugački, lancetasta oblika, dvostruko ili trostruko perasto razdijeljeni te mogu biti prekriveni dlačicama. Listovi su izmjenično smješteni na stabljici te su bazalni listovi većih dimenzija od listova koji se nalaze na gornjem djelu stabljike (Akram, 2013). Cvat je sastavljena gronja koja se sastoji od brojnih, malih bijelih glavica koji se sastoje od cjevastih i jezičastih cvjetova (Slika 2.1.2.2.).



Slika 2.1.2.2. Cvat stolisnika

Autor: Novosel A., 2024.

Plod je sjajna roška veličine 2 mm bez papusa (Akram, 2013). Biljka cvate u periodu od svibnja pa sve do rujna (Mollasalehi i sur., 2013; Ali i sur., 2017).

2.1.3. Kemijska svojstva

Kemijski sastav stolisnika vrlo dobro je istražen te su do danas identificirani brojni kemijski spojevi koji ga čine i to od bioaktivnih spojeva, posebice polifenola (flavonoida) kao i spojeva sastavnica eteričnog ulja. No, valja naglasiti kako kemijski sastav može varirati ovisno o ekotipu, kemotipu, fenofazi biljke, kao i o nadmorskoj visini i okolišnim čimbenicima poput temperature, količini sunčeve svjetlosti i relativne vlage zraka (Farasati Far i sur., 2023).

Polifenoli i flavonoidi ukupno obuhvaćaju oko 70 identificiranih spojeva u stolisniku te je njihova prisutnost zabilježena u različitim biljnim dijelovima. Od spojeva koji pripadaju skupini polifenola prisutni su: kolin (Borrelli i sur., 2012), 1,3-dikafeoilkvininska kiselina (DCQA), 1,4-DCQA, 3,4-DCQA (Benedek i sur., 2007a; Vitalini i sur., 2011), 3,5-DCQA (Innocenti i sur., 2007; Benedek i sur., 2007a; Fraisse i sur., 2011; Vitalini i sur., 2011), 1, 5-DCQA (Fraisse i sur., 2011), 4, 5, DCQA (Benedek i sur., 2007a; Fraisse i sur., 2011), 4-O-glikozid, luteolin 4-O-glikozid (Vitalini i sur., 2011), klorogenska kiselina (Tunón i sur., 1994; Innocenti i sur., 2007; Benetis i sur., 2008; Fraisse i sur., 2011; Vitalini i sur., 2011), luteolin-7- β -D-glukuronid (Benedek i sur., 2007a), kafeinska kiselina (Tunón i sur., 1994; Wojdyło i sur., 2007; Yassa i sur., 2007; Pires i sur., 2009), p-kumarinska kiselina, neoklorogenska kiselina (Wojdyło i sur., 2007), ferulinska kiselina (Tunón i sur., 1994; Wojdyło i sur., 2007), stahidrin, salicilna kiselina, katekol, mandelična kiselina i metil esteri kaprilne, linolenske i undecilenske kiseline (Tunón i sur., 1994).

Dok su od flavonoida prisutni: resveratrol, miricetin, naringin, naringenin (Keser i sur., 2013), kvercetin, kempferol (Greger, 1969; Wojdyło i sur., 2007; Keser i sur., 2013), 1,10-sekogvajalonid, millifolid A, B i C, izo-sekotanapartolid, arteludooikinolid A, 3-acetil-izo-sekotanapartolid, 3-metoksitanapartolid, seko-tanapartolid A, seko tanapartolid, 5-epi-sekotanapartolid A (Li i sur., 2012), achillinin A (Li i sur., 2011), apigenin 7-O-glukozid, luteolin 7-O-glukozid (Horhammer, 1961; Horhammer i sur., 1964; Oswiecimska i Miedzobrodzka, 1966; Kaloshina i Neshta, 1973; Schulz i Albroscheit, 1988 Benedek i sur., 2007a; Yassa i sur., 2007; Vitalini i sur., 2011), apigenin, luteolin (Guédon i sur., 1993; Innocenti i sur., 2007; Benedek i sur., 2007a; Wojdyło i sur., 2007; Csupor-Löffler i sur., 2009), centaureidin (Csupor-Löffler i sur., 2009), kasticin (Falk i sur., 1975; Haidara i sur., 2006; Csupor-Löffler i sur., 2009), luteolin-3,7-di-O-glukozid, vicenin-2 (Benetis i sur., 2008), artemisin (Falk i sur., 1975; Ivancheva i sur., 2002; Csupor-Löffler i sur., 2009), rutin (Neshta i sur., 1972; Kaloshina i Neshta, 1973; Pires i sur., 2009; Benedek i sur., 2007a; Innocenti i sur., 2007; Vitalini i sur., 2011), dihidrodehidrodiconiferil alkohol glukopiranozid, 9-O- β -D apigenin-7-O- β -D-glukopiranozid, luteolin-7-O- β -D-glukopiranozid, luteolin-4-O- β -D-glukopiranozid (Innocenti i

sur., 2007), 5-hidroksi 3,40, 6,7-tetrametoksi flavon (Falk i sur., 1975; Gadgoli i Mishra, 2007), izoramnetin (Greger, 1969; Falk i sur., 1975; Wojdyło i sur., 2007), acacetin (Greger, 1969), krizofanska kiselina D, salvigenin, kvercetagetin, hispidulin, cirsimari, nepetin, viteksin, vicenin, kvercetin-3-O-glikozid, kvercetin-3-O-ramnoglikozid, luteolin-7-O-glikozid, diosmetin-7-O-glikozid i kempferol-3-O-glikozid (Ivancheva i sur., 2002).

Eterično ulje predstavlja treću glavnu kemijsku sastavnicu stolisnika te se najveća količina nalazi u cvatu. Ono se sastoji od mješavine monoterpena i seskviterpena, gdje monoterpeni mogu činiti i do 90 % sastava.

Monoterpeni koji su prisutni u sastavu eteričnog ulja stolisnika su: pinen, β -felandren (Hofmann i sur., 1992; Rohloff i sur., 2000; Anne i sur., 2001; Boskovic i sur., 2005; Nemeth, 2005; Bimbiraite i sur., 2008; Conti i sur., 2010; Falconieri i sur., 2011; Nadim i sur., 2011; Costescu i sur., 2014; Kazemi, 2015; Sevindik i sur., 2016), p-cimen (Anne i sur., 2006; Jaimand i sur., 2006; Nadim i sur., 2011; Yousefzadeh i Zeinivand, 2013; Ebadollahi i sur., 2016), α -tujon, β -tujon, α terpinen, γ -terpinen (Mazandarani i sur., 2013), kamfen, limonen (Bimbiraite i sur., 2008; Nadim i sur., 2011; Kazemi, 2015), sabinen (Boskovic i sur., 2005; Conti i sur., 2010; Nadim i sur., 2011), kamfor, borneol, bornil acetat (Candan i sur., 2003; Boskovic i sur., 2005; Rahimmalek i sur., 2009; Conti i sur., 2010; Mazandarani i sur., 2013; Kazemi, 2015; Ebadollahi i sur., 2016; Sevindik i sur., 2016), piperiton (Ebadollahi i sur., 2016), karvakrol, karvon (Kazemi, 2015), 1, 8 cineol (Bezić i sur., 2003; Candan i sur., 2003; Anne i sur., 2006; Rahimmalek i sur., 2009; Conti i sur., 2010; Judzentiene i Mockute, 2010; Nadim i sur., 2011; Yousefzadeh i Zeinivand, 2013; Sevindik i sur., 2016), α -terpineol, terpinen-4-ol (Candan i sur., 2003; Nadim i sur., 2011; Sevindik i sur., 2016), artemisia keton (Conti i sur., 2010; Mazandarani i sur., 2013), linalol, fenhil acetat (Anne i sur., 2006; Mazandarani i sur., 2013), dihidrokarveol, hrisantenil acetat (Yousefzadeh i Zeinivand, 2013), trans-tujon, trans-hrisantenil acetat (Falconieri i sur., 2011) i mircen (Bezić i sur., 2003).

Od seskviterpena prisutni su: β -kariofilen (Bezić i sur., 2003; Conti i sur., 2010; Anne i sur., 2006; Costescu i sur., 2014; Sevindik i sur., 2016), β -kubeben (Costescu i sur., 2014), germakren-D i B (Hofmanne i sur., 1992; Lourenco i sur., 1999; Anne i sur., 2001; Boskovic i sur., 2005; Nemeth, 2005; Jaimand i sur., 2006; Santoro i sur., 2007; Bimbiraite i sur., 2008; ; Rahimmalek i sur., 2009; Costescu i sur., 2014), α -azaron, β -bisabolen (Falconieri i sur., 2011), biciklogermakren (Rahimmalek i sur., 2009), α humulen, kadinen (Bimbiraite i sur., 2008), γ -murolen (Anne i sur., 2006), α -elemen, trans- β -farnesen, α -kadinen, germakren-D-4-ol (Lourenco i sur., 1999), umbelulon (Yousefzadeh i Zeinivand, 2013), viridiflorol, 10 epi- γ -eudesmol, selin-11-en-4 α -ol (Judzentiene, 2016), bisabolol-oksidi (Anne i sur., 2001; Nemeth, 2005; Costescu i sur., 2014), kariofilen oksid (Boskovic i sur., 2005; Anne i sur., 2006; Conti i sur., 2010; Judzentiene i Mockute, 2010; Sevindik i sur., 2016), nerolidol, eudesmol (Judzentiene i Mockute, 2010), spatulenol (Rahimmalek i sur., 2009), β bisabolol (Anne i sur., 2006), α -bisabolol, β eudesmol, γ -eudesmol (Candan i sur., 2003).

Osim monoterpena i seskviterpena u eteričnom ulju stolisnika prisutan je azulen i kamazulen (Hofmann i sur., 1992; Anne i sur., 2001; Nemeth, 2005; Anne i sur., 2006; Jaimand i sur., 2006; Santoro i sur., 2007; Rahimmalek i sur., 2009; Nadim i sur., 2011; Mazandarani i sur., 2013; Costescu i sur., 2014) koji ulju daju specifično plavo obojenje.

2.1.4. Povijest upotrebe, tradicionalna primjena i ljekovita svojstva

Stolisnik je jedna od najpoznatijih ljekovitih biljnih vrsta na svijetu, a svoje ime dobio je prema Ahileju, junaku iz grčke mitologije, koji je njome liječio svoje rane kao i rane svojih vojnika (Benedek i sur., 2007b).

Povijest upotrebe ove vrste stara je gotovo koliko i samo čovječanstvo. Prvi tragovi upotrebe pronađeni su u pećini Shanidar u Iraku, gdje su uz kosti neandertalaca, pronađeni ostatci peludi stolisnika čija starost se procjenjuje na 65 000 pr.Kr. (Leroi, 1975; Solecki, 1975).

Prvi pisani tragovi upotrebe na području Europe datiraju iz perioda antike. Autori tih zapisa su Plinije Stariji (23. – 79. po. Kr.) rimski pisac i znanstvenik i Pedanije Dioskorid (40. – 90. po. Kr.) grčki liječnik, farmakolog i botaničar koji u svojim djelima opisuju samu biljku i njezinu upotrebu u liječenju čovjeka. Pedanije Dioskorid opisuje stolisnik kao biljku koja se koristi pri zaustavljanju krvarenja, za menstrualne tegobe, za različite upale te kako se dekoka može koristiti za liječenje dizenterije (Osbaldeston i Wood, 2000), dok Plinije Stariji spominje upotrebu ove vrste kod probavnih tegoba, upale uha, ali također i kod krvarenja i menstrualnih tegoba (Applequist i Moerman, 2011; Ali i sur., 2017). Ovi zapisi nedavno su potkrijepljeni i dokazima s potonulog rimskog broda koji je 1980-ih pronađen na obali Toskane, a pretpostavlja se da je potonu između 140 i 120 godine pr. Kr. Naime, na brodu su među medicinskim potrepštinama pronađene tablete načinjene od biljnog materijala, a nakon njihove detaljne DNA analize ustanovljeno je kako je određen broj tableta izrađen od stolisnika (Applequist i Moerman, 2011).

Upotreba stolisnika proširila se i opstala od antike pa sve do danas, a on je postao sastavnicom tradicionalne medicine gotovo svih naroda (Tablica 2.1.4.1.). Tako ga narodi na području Euroazije tradicionalno koriste u obliku uvaraka i tinktura (Gorni i sur., 2021) kod probavnih tegoba, menstrualnih tegoba, upala, gubitka apetita, kao dijaforetik, za liječenje rana kao i vanjskih krvarenja, za liječenje hemoroida, varikoznih vena, tuberkuloze i zmijskih ugriza (Blumenthal i sur., 1998; Allen i Hatfield, 2004; Applequist i Moerman, 2011).

Tablica 2.1.4.1. Tradicionalna upotreba stolisnika kod različitih naroda

NAROD	UPOTREBA	IZVOR
Italija	Menstrualne tegobe, probavne tegobe, diuretik, bolesti urinarnog trakta, zubobolja i sedativ	Applequist i Moerman (2011)
Njemačka	Probavne tegobe i gubitak apetita	Blumenthal i sur. (1998)
Mađarska	Unutarnje bolesti (npr. upale, bolesti bubrega, probavnog sustava, jetre), opekline i rane	Applequist i Moerman (2011)
Velika Britanija i Irska	Rane, epistaksa, menstrualne tegobe, visoki krvni tlak, infekcije dišnog sustava, groznica i reuma	Allen i Hatfield (2004)
Iran	Upale, menstrualne tegobe, probavne tegobe, hemoroidi, gastritis i bolovi	Miraldi i sur. (2001)
Kina	Zmijski ugrizi, hemoroidi, varikozne vene, menstrualne tegobe i tuberkuloza	Applequist i Moerman (2011)
Indija	Probavne tegobe i groznica	Sharma i sur. (2004)
Peru	Gastritis, dijabetes, kolesterol i kožne infekcije	Bussmann i sur. (2007)
Brazil	Rane, kožna oboljenja, proljev i probavne tegobe	Pires i sur. (2009); Baggio i sur. (2008)

Dok narodi na području Sjeverne, Središnje i Južne Amerike koriste, također u obliku uvaraka i tinktura, za gastritis, dijabetes, povišeni kolesterol, kožne upale, rane, probavne tegobe, probleme dišnog sustava, zubobolje, očne bolesti, bolesti jetre i bubrega (Bussman i sur., 2007; Baggio i sur., 2008; Pires i sur., 2009; Applequist i Moerman, 2011).

Ljekovit dio stolisnika je svježi ili sušeni nadzemni dio (biljna droga: *Millefolii herba*) koji se najčešće konzumira u obliku uvaraka ili tinkture, a čije djelovanje je adstringentno, analgetsko, antidijabetičko, antioksidativno, antiflogističko, antimikrobno, antitumorno, digestivno, dijaforetičko, hepaprotektivno, karminativno, sedativno i spazmolitičko (Yassa i sur., 2007; Tajik i sur., 2008; Lazarevic i sur., 2010; Akram, 2013; Fierascu i sur., 2015; Al-Ezzy i sur., 2017; El-Kalamouni i sur., 2017; Chávez-Silva i sur., 2018; Mouhid i sur., 2018; Sayed i

Bano, 2018; Villalva i sur., 2019; Gorni i sur., 2021). Široki spektar djelovanja i primjene pripisuje se njegovom kemijskom sastavu koji se najvećim dijelom sastoji od eteričnog ulja, polifenola i flavonoida (Villalva i sur., 2022).

Osim upotrebe u tradicionalnoj i alternativnoj medicini, stolisnik se upotrebljava i u agronomiji, gdje se koristi kao prirodni insekticid i repelent, gnojivo, stočna hrana i poboljšivač razgradnje komposta (Hulina, 1998), kao i u veterinarskoj medicini.

2.1. Metode ekstrakcije

2.1.1. Maceracija

Maceracija (eng. *maceration*) je jednostavan i učinkovit postupak ekstrakcije (iscrpljivanja) biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala (Ćujić i sur., 2016; Monton i sur., 2019; Cvetanović i sur., 2020), pri kojem se kao ekstrakcijsko sredstvo koristi neka vrsta otapala (npr. destilirana voda, alkohol, ulje, itd.).

Ova metoda ekstrakcije ima brojne prednosti. Glavna je ta što se ova metoda ekstrakcije odvija pri sobnoj temperaturi zbog čega je vrlo pogodna za ekstrakciju termolabilnih spojeva. Dok su još neke od važnijih prednosti te što ova metoda ne zahtjeva dugotrajnu pripremu, ne uključuje skupu laboratorijsku opremu i za ekstrakciju se mogu koristiti brojne vrste otapala (Uysal i sur., 2019). Jedan od glavnih nedostataka ove metode je duže vrijeme tretmana, a koje najčešće, ovisno o tipu biljnog materijala, ali i vrsti proizvoda minimalno traje 24 sata.

2.1.2. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija

Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija (eng. *Microwave assisted extraction*, MAE) je je visokoučinkovita, jednostavna, brza i ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala (Eskilsson i Björklund, 2000). Funkcionira na principu djelovanja elektromagnetskih valova mikrovalnog područja (300 MHz do 300 GHz) na polarizirane molekule biljnog materijala (npr. vodu) što uzrokuje brze rotacije takvih molekula, njihovo brže kretanje (vibracija), što posljedično uzrokuje trenje i razvoj topline te porast temperature sustava (Eskilsson i Björklund, 2000). Porast temperature sustava uzrokuje zagrijavanje tekućine u biljnim stanicama, čime tekućina počinje isparavati i vršiti pritisak na staničnu stijenkicu te u konačnici dolazi do pucanja stanične stijenske pri čemu se stanični sadržaj otpušta u otapalo (Mandal i sur., 2007).

Postoje dva tipa komercijalno dostupnih sustava mikrovalno potpomognute ekstrakcije. Prvi tip je ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, dok je drugi tip mikrovalna pećnica koja vrši ekstrakciju pri atmosferskom tlaku (Kaufmann i Christen, 2002).

Za mikrovalno potpomognutu ekstrakciju mogu se koristiti svježi i sušeni biljni materijal, a parametri koji su važni za optimizaciju ekstrakcije su: vrsta otapala, volumen otapala, temperatura pri kojoj se odvija ekstrakcija, vrijeme ekstrakcije kao i sastav matriksa, uključujući sadržaj vode (Eskilsson i Björklund, 2000).

Izbor otapala vrlo je važan te ovisi o mogućnosti otapala da apsorbira mikrovalove, o interakciji između otapala i matriksa i topljivosti željenog ekstrakta. Najčešće korištena otapala su destilirana voda, metanol i etanol, jer posjeduju dovoljnu polarnost (Font i sur., 1998; Brachet i sur., 2002). Pri ekstrakciji određenih termolabilnih spojeva ne preporuča se korištenje vode kao otapala, zbog njezina niska faktora disipacije koji dovodi do pregrijavanja (Andrade i sur., 2023). Volumen korištenog otapala ovisi o količini biljnog materijala i sastavnici koju želimo ekstrahirati, no u prosjeku je puno manji nego kod drugih metoda ekstrakcije (Eskilsson i Björklund, 2000).

Temperatura i vrijeme također su važni čimbenici koji utječu na učinkovitost ove metode. Primjenom visokih temperatura povećava se učinkovitost ekstrakcije, dok se primjenom niskih temperatura može izvršiti efikasna ekstrakcija termolabilnih sastavnica, poput eteričnog ulja (Brachet i sur., 2002). Vrijeme koje je potrebno za efektivnu ekstrakciju u prosjeku iznosi 10 minuta, što je u usporedbi s drugim ekstrakcijskim metodama kao na primjer maceracijom vrlo kratko (Eskilsson i Björklund, 2000).

2.1.3. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija (eng. *Ultrasound assisted extraction*, UAE) je neinvazivna, netopliniska, visoko energetska učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda. Karakterizira ju brz i jednostavan postupak pri kojem se može izvršiti ekstrakcija relativno velike masa uzorka, a da se pritom očuvaju svi osjetljivi spojevi, poput antioksidansa (Fu i sur., 2006; Vázquez-Sánchez i sur., 2019; Alcántara i sur., 2020). Također ova metoda efektivno ekstrahira ciljane spojeve s utroškom manjih količina otapala u odnosu na neke druge konvencionalne metode (Luque de Castro i Priego-Capote, 2007).

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija funkcionira na principu ultrazvučnih valova visokog intenziteta i niske frekvencije koji uzrokuju pojavu prijelazne kavitacije. Pojava kavitacije uzrokuje stvaranje mjehurića, koji djelovanjem prijelazne kavitacije pucaju što dovodi i do pucanja stanične stijenke i oslobađanja staničnog sadržaja u otapalo (Romero i sur., 2010; Veillet i sur., 2010; Hossain i sur., 2012; Dent i sur., 2015). Zahvaljujući toj pojavi, proces ekstrakcije, se ubrzava te se također povećava i njegova učinkovitost. Dva najčešće korištena tipa sustava ultrazvučne ekstrakcije su: sustav ultrazvučne sonde i ultrazvučna kupelj.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Nadzemni dio biljaka stolisnika (0,5 kg) uzorkovan je u stadiju pune cvatnje, na području naselja Cvetković - Jastrebarsko (45°38'36.5"N, 15°38'55.0"E) u lipnju 2024. godine. Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku do sadržaja vlage od 10 do 12 %.

Prije provođenja ekstrakcijskih metoda, biljni materijal je usitnjen u prah (Slika 3.1.2.), uređajem Microtron MB 550 (Kinematica AG, Luzern, Switzerland) (Slika 3.1.1.).

Uz ispitivanje učinkovitosti maceracije, mikrovalno i ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u izdvajanju bioaktivnih spojeva stolisnika dodatno je provedena i analiza početnog biljnog materijala (praha stolisnika).



Slika 3.1.1. Usitnjavanje biljnog materijala
Autor: Novosel A., 2024.



Slika 3.1.2. Prah dobiven usitnjavanjem
biljnog materijala
Autor: Novosel A., 2024.

3.2. Maceracija

Ekstrakcijska metoda maceracijom provedena je u laboratoriju Zavoda za biljnu bioraznolikost, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta te je provedena u dva ponavljanja.

Na analitičkoj vagi (Radwag PS 1000.R2) odvagano je 2 g praha stolisnika. Odvagana količina praha prenesena je u laboratorijsku čašu volumena 250 mL te je dodano 200 mL destilirane vode (Slika 3.2.1.). Čaša s uzorkom prekrivena je parafilmom i ostavljena da stoji 24 sata na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Nakon 24 h (Slika 3.2.2.), pripremljeni uzorci su profiltirani pomoću Whatmanovog filtera papira, a dobiveni ekstrakt pohranjen je u hladnim i mračnim uvjetima do provođenja daljnjih analiza.



Slika 3.2.1. Svježe pripremljeni uzorci
Autor: Novosel A., 2024.



Slika 3.2.2. Uzorci nakon 24 h
Autor: Novosel A., 2024.

3.3. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija

Metoda mikrovalno potpomognute ekstrakcije provedena je u laboratoriju Zavoda za biljnu bioraznolikost, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

Na analitičkoj vagi (Radwag PS 1000.R2) odvagano je 5 g praha stolisnika. Odvagana količina praha prenesena je u tikvicu za destilaciju volumena 500 mL te je dodano 500 mL

destilirane vode. Tikvica za destilaciju potom je stavljena u uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (ETHOS X, Milestone) (Slika 3.3.1.).



Slika 3.3.1. Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija
Autor: Novosel A., 2024.

Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija provedena je u trajanju od 5 i 10 minuta, pri snazi mikrovalova od 800 W i temperaturi od 60 °C. Ekstrakcija je provedena u dva ponavljanja.

Dobiveni ekstrakti, odmah nakon tretmana filtrirani su pomoću Whatmanovog filter papira te su pohranjeni u hladnim i mračnim uvjetima do provođenja daljnjih analiza.

3.4. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija provedena je u Laboratoriju za analizu kvalitete poljoprivrednih proizvoda biljnog porijekla, Zavoda za održive tehnologije i obnovljive izvore energije, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

Odvagana su 2 g praha stolisnika. Odvagana količina praha prenesena je u laboratorijsku čašu volumena 250 mL te je dodano 200 mL destilirane vode. Pripremljeni uzorak tretiran je ultrazvukom visokog intenziteta frekvencije 35 kHz i nominalne maksimalne snage uređaja od 140 W u sustavu ultrazvučne sonde (Bandelin HD 2000.2, Njemačka) (Slika 3.4.1), u trajanju od 5 i 10 minuta pri amplitudi od 60 %. Svako tretiranje provedeno je u dva ponavljanja.



Slika 3.4.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija sa sustavom izravne sonde
Autor: Novosel A., 2024.



Slika 3.4.2. Filtracija dobivenih ekstrakata
Autor: Novosel A., 2024.

Dobiveni ekstrakti filtrirani su pomoću Whatmanovog filter papira te su pohranjeni u hladnim i mračnim uvjetima do provođenja daljnjih analiza (Slika 3.4.2.).

3.5. Analiza bioaktivnih spojeva ekstrakata i praha stolisnika

Analiza kemijskog sastava praha stolisnika i ekstrakata stolisnika provedena je u Laboratoriju za analizu kvalitete poljoprivrednih proizvoda biljnog porijekla, Zavoda za održive tehnologije i obnovljive izvore energije, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

3.5.1. Određivanje sadržaja vitamina C

Postoje različite metode određivanja udjela L - askorbinske kiseline, dehidroaskorbinske kiseline i njihovog ukupnog sadržaja (vitamina C), a zasnivaju se na reverzibilnoj sposobnosti sustava. 2,6-diklorfenolindofenol oksidira L - askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa služi istovremeno i kao

indikator ove redoks reakcije. Ova se metoda primjenjuje za određivanje sadržaja askorbinske kiseline u proizvodima od voća i povrća.

a) Ekstrakt stolisnika

Aparatura i pribor:

- tehnička vaga
- odmjerna tikvica volumena 50 mL
- Erlenmeyerova tikvica
- bireta

Kemikalije:

- oksalna kiselina (2 %)
- 2,6-diklorfenolindofenol (svježe pripremljen)

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL odvaži se 5 g ekstrakta na tehničkoj vagi (s točnošću $\pm 0,01$). Tikvica se nadopuni do oznake oksalnom kiselinom (2 %). Otpipetira se 10 mL sadržaja tikvice u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 50 mL i titrira se otopinom 2,6-diklorfenolindofenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem pet sekundi. Iz volumena 2,6-diklorfenolindofenola utrošenog za titraciju filtrata, izračuna se količinu L-askorbinske kiseline (vitamina C) u uzorku, koja se izražava u mg/100g svježe mase.

Račun:

$$\text{vitamin C (mg/100 g sv. t.)} = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

gdje je:

V - mL utrošenog 2,6-diklorfenolindofenola pri titraciji

F^* - faktor otopine 2,6-diklorfenolindofenola

D - masa uzorka u filtratu u gramima

*Određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindofenola:

Za određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindofenola potrebno je napraviti otopinu askorbinske kiseline koja će se titrirati otopinom 2,6-diklorfenolindofenola. Prema očitano

volumenu potrebnog 2,6-diklorfenolindofenola izračuna se faktor te otopine. U odmjernu tikvicu od 50 mL na analitičkoj vagi odvagane se $\pm 0,0100$ g askorbinske kiseline, a tikvica nadopuni do oznake 2 %-tnom otopinom oksalne kiseline. U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL otpipetira se 5 mL 2 %-tne otopine oksalne kiseline i 5 mL pripremljene otopine askorbinske kiseline te se titrira otopinom 2,6- diklorfenolindofenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana. Iz podatka utrošenog volumena otopine 2,6-diklorfenolindofenola potrebnog za titraciju određene mase askorbinske kiseline izračuna se faktor (F) otopine 2,6-diklorfenolindofenola.

b) Prah stolisnika

Aparatura i pribor:

- tehnička vaga
- odmjerna tikvica volumena 100 mL
- čaša volumena 100 mL
- lijevak
- filter papir
- Erlenmeyerova tikvica
- bireta

Kemikalije:

- oksalna kiselina (2 %)
- 2,6-diklorfenolindofenol (svježe pripremljen)

Postupak određivanja:

Na odmjernu tikvicu od 100 mL postavi se običan lijevak te se preko njega u tikvicu izvaže 10 g uzorka na tehničkoj vagi (s točnošću $\pm 0,01$). Takav uzorak kvantitativno se prenosi u tikvicu pomoću 2 %-tne otopine oksalne kiseline. Tikvica se do oznake nadopuni otopinom oksalne kiseline (2 %). Sadržaj iz odmjerne tikvice se profiltrira, a dobiveni filtrat se dalje koristiti za određivanje askorbinske kiseline. Otpipetira se 10 mL filtrata u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 50 mL i titrira se otopinom 2,6-diklorfenolindofenola do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem pet sekundi. Iz volumena 2,6-diklorfenolindofenola utrošenog za titraciju filtrata, izračuna se količinu L-askorbinske kiseline (vitamina C) u uzorku, koja se izražava u mg/100 g svježe mase.

Račun:

$$\text{vitamin C (mg/100 g sv. t.)} = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

gdje je:

V - mL utrošenog 2,6-diklorfenolindofenola pri titraciji

*F** - faktor otopine 2,6-diklorfenolindofenola

D - masa uzorka u filtratu u gramima

*Određivanje faktora otopine 2,6-diklorfenolindofenola isto kao i za ekstrakt stolisnika

3.5.2. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određuju se Folin-Ciocalteu metodom, koja se zasniva na obojenoj reakciji koju fenoli razvijaju s Folin-Ciocalteu reagensom. Naime, Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline, koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva iz uzorka reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavog obojenja. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 750 nm.

a) Ekstrakt stolisnika

Aparatura i pribor:

- odmjerna tikvica (50 mL)
- pipeta
- kivete
- spektrofotometar (Schimadzu 1900i)

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteu reagens
- zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL otpipetira se 1 mL ekstrakta i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog u omjeru 1:2 destiliranom vodom) i pusti se da odstoji 3 minute. Nakon toga se u tikvicu dodaju 3 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Sadržaj tikvice dobro se promućka i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Uzorci se ostavljaju da odstoje 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali izmjeri se apsorbancija otopina pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

b) Prah stolisnika

Aparatura i pribor:

- tehnička vaga
- konusna tikvica
- odmjerna tikvica (50 i 100 mL)
- lijevak
- filter papir
- povratno hladilo
- pipeta
- kivete
- spektrofotometar (Schimadzu 1900i)

Kemikalije:

- etanol (80 %)
- Folin-Ciocalteu reagens
- zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Postupak određivanja:

Na tehničkoj vagi odvaži se 10 g uzroka (s točnošću $\pm 0,01$) i homogenizira s 40 mL 80 %-tnog etanola. Homogena smjesa kuha se 10 min uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt filtrira se u odmjernu tikvicu od 100 mL preko naboranog filter papira. Zaostali talog zajedno s filter papirom ponovno se prebacuje u tikvicu sa šlifom, dodaje se 50 mL 80 %-tnog etanola i uz povratno hladilo kuha se još 10 min (Slika 3.5.2.1.). Dobiveni ekstrakt spaja se s prethodno dobivenim ekstraktom i odmjerna tikvica se nadopuni do oznake 80 %-tnim etanolom. U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta i redom se dodaju: 30 mL destilirane

vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog u omjeru 1:2 destiliranom vodom) i 7,5 mL otopine zasićenog natrijeva karbonata. Sadržaj tikvice dobro se promućka i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Uzorci se ostavljaju da odstoje 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci odstajali izmjeri se apsorbancija otopina pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca odvaži se 500 mg galne kiseline i otopi je se u 80 %-tnom etanolu, nakon čega se odmjerne tikvice, volumena 100 mL, napuni do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline pripreme se razrijeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL, na način da se otpipetira redom 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL temeljne standardne otopine („stock“ otopina) u svaku tikvicu te ih se potom nadopuni do oznake 80 %-tnim etanolom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50, 150, 250 i 500 mg/L.

U odmjerne tikvice od 50 mL otpipetira se 0,5 mL uzorka iz tikvica i dodaje se 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i nakon 3 minute 7,5 mL otopine zasićenog natrijevog karbonata. Sadržaj tikvica dobro se promiješa, nadopuni do oznake te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon što uzorci odstajali izmjeri se apsorbancija otopine spektrofotometrom pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz izmjerenih vrijednosti nacrti se baždarni pravac tako da na apscisi budu koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbance.

Račun:

Baždarni pravac nacrti se na računalu u programu Microsoft Excel, te se izračuna jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih polifenola

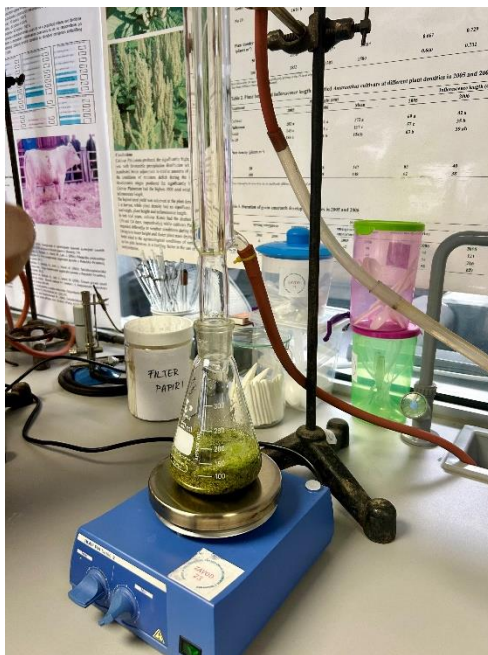
Formula:

$$y = 0,001x + 0,0436$$

gdje je:

y – apsorbancija na 750 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)



Slika 3.5.2.1. Priprema ekstrakta kuhanjem uz povratno hladilo
Autor: Novosel A., 2024.

3.5.3. Određivanje flavonoida i neflavonoida

Za taloženje flavonoidnih fenolnih spojeva preporuča se upotreba formaldehida. Formaldehid reagira s C-6 ili C-8 pozicijom na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojevima također na C-6 ili C-8 poziciji. Pri tome nastaju kondenzirane molekule koje se uklone filtriranjem. Ostatak neflavonoidnih fenola određuje se po metodi za ukupne polifenole. Razlika ukupnih polifenola i neflavonoida daje količinu flavonoida.

a) Ekstrakt stolisnika

Aparatura i pribor:

- odmjerna tikvica (25 i 50 mL)
- pipeta
- kivete
- spektrofotometar (Schimadzu 1900i)

Kemikalije:

- klorovodična kiselina (HCl) (razrijeđena s vodom u omjeru 1:4)
- formaldehid (13 mL 37 %-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- dušik za propuhivanje uzoraka
- Folin-Ciocalteu reagens
- zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu volumena 25 mL otpipetira se 1 mL ekstrakta, 1 mL klorovodične kiseline i 0,5 mL formaldehida. Smjesa se propuše dušikom, zatvori i ostavi u mraku na sobnoj temperaturi 24 sata. Nakon 24 sata uzorak se filtrira filter papirom te slijedi isti postupak kao i kod određivanja ukupnih polifenola (Slika 3.5.3.1.).



Slika 3.5.3.1. Pripremljeni uzorci za određivanje flavonoida i neflavonoida

Autor: Novosel A., 2024.

Račun:

Koncentracija neflavonoida izračunava se na način jednak izračunavanju koncentracije ukupnih polifenola uzimajući u obzir dodatna razrijeđenja. Količina ukupnih flavonoida odredi se izračunom razlike količine ukupnih polifenola i neflavonoida.

b) Prah stolisnika

Aparatura i pribor:

- tehnička vaga
- konusna tikvica
- odmjerna tikvica (25, 50 i 100 mL)
- lijevak
- filter papir
- povratno hladilo
- pipeta
- kivete
- spektrofotometar (Schimadzu 1900i)

Kemikalije:

- etanol (80 %)
- klorovodična kiselina (HCl) (razrijeđena s vodom u omjeru 1:4)
- formaldehid (13 mL 37%-tnog formaldehida u 100 mL vode)
- dušik za propuhivanje uzoraka
- Folin-Ciocalteu reagens
- zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3)

Postupak određivanja:

Ekstrakt ukupnih polifenola (opisan u poglavlju 3.5.2.) koristi se i pri određivanju flavonoida i neflavonoida.

U odmjernu tikvicu volumena 25 mL otpipetira se 10 mL ekstrakta, 5 mL otopine klorovodične kiseline (1:4) i 5 mL formaldehida. Smjesa se propuše dušikom, zatvori i ostavi u mraku na sobnoj temperaturi 24 sata. Nakon 24 sata uzorak se filtrira filter papirom te slijedi isti postupak kao i kod određivanja ukupnih polifenola.

Račun:

Koncentracija neflavonoida izračunava se na način jednak izračunavanju koncentracije ukupnih polifenola uzimajući u obzir dodatna razrijeđenja. Količina ukupnih flavonoida utvrđuje se izračunom razlike količine ukupnih polifenola i neflavonoida.

3.5.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

ABTS metoda temelji se na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonsa kiselina) (ABTS + radikal-kationa) koji se oblikuje bilo kemijskom ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS+ kation se reducira u ABTS, a reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6 hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) pri istim uvjetima.

Priprema ABTS reagensa:

1. dan:

Priprema 140 mM otopine kalijeva persulfata; $K_2S_2O_8$ (0,1892 g $K_2S_2O_8$ izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjerne tikvici od 10 mL).

Priprema 7 mM ABTS otopine (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjerne tikvici od 10 mL).

Priprema stabilne ABTS^{•+} otopine: 88 μ L $K_2S_2O_8$ otopine (140mM) prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a; sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati pri sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava.

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1 %-tna otopina ABTS^{•+} (1 mL ABTS^{•+} otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake). Nakon toga mjeri se apsorbancija 1 %-tne otopine ABTS^{•+} pri 734 nm koja mora iznositi $0,70 \pm 0,02$. Ako apsorbancija otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbancija premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-tne otopine ABTS^{•+} treba dodati još par kapi stabilne ABTS^{•+} otopine, a ako je apsorbancija prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu (100 mL) dodati još 96 %-tnog etanola.

NAPOMENA: Isti dan kada se pripremi 1 %-tna otopina ABTS^{•+} s podešenom apsorbancijom na $0,70 \pm 0,02$ treba napraviti i sve analize uzoraka (i baždarni pravac ako je to potrebno) jer je ABTS^{•+} otopina nestabilna i nepostojana već unutar 24 sata.

Priprema uzorka za analizu:

Procedura ekstrakcije iz uzoraka ista je kao i u protokolu određivanja fenola Folin Ciocalteu metodom. Deset g uzorka izvaže se izravno u Erlenmeyerovu tikvicu sa šlifom (300 mL) i doda se 40 mL 80 %-tnog etanola te se kuha uz povratno hladilo 10 minuta. Nakon kuhanja sadržaj se profiltrira u odmjernu tikvicu od 100 mL. Ostatak taloga zajedno s filter papirom prebaci se u Erlenmeyerovu tikvicu (istu, 300 mL), doda se 50 mL etanola i ponovno kuha 10 minuta uz hladilo. Nakon toga sadržaj se profiltrira u istu tikvicu od 100 mL, odnosno ekstrakti se spoje, ohlade, nakon čega se odmjerna tikvica od 100 mL nadopuni 80 %-tnim etanolom do oznake. Ako je potrebno ekstrakte treba razrijediti 80 %-tnim etanolom (u slučaju prevelike apsorbance).

Postupak određivanja (spektrofotometrijski):

160 μ L uzorka (ekstrakta) pomiješa se s 2 mL 1 %-tne otopine ABTS^{•+} te se nakon 1 minute mjeri apsorbance na 734 nm. Za slijepu probu koristi se 96 %-tni etanol.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca u ABTS metodi koristi se Trolox koji uzrokuje smanjenje boje ABTS^{•+} otopine.

Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 μ mol/dm³.

Najprije se pripremi temeljna standardna otopina („stock“ otopina) i to tako da se u odmjernu tikvicu od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80 %-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz stock otopine uzimaju se sljedeći volumeni Trolox-a za pripremu daljnjih razrjeđenja (u odmjernim tikvicama od 25 mL):

- 0 → 0 mL Trolox
- 100 → 0,4 mL
- 200 → 0,8 mL
- 400 → 1,6 mL
- 1000 → 4 mL
- 2000 → 8 mL
- 2500 → 10 mL

Od svake koncentracije Trolox-a uzima se 160 μL i dodaje se 2 mL 1 %-tne ABTS^{•+} otopine podešene apsorbance ($0,70 \pm 0,02$) te se mjeri apsorbanca pri 734 nm. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbance za svaku koncentraciju napravi se baždarni pravac.

3.5.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda bazira se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt na principu redukcije Fe^{3+} iona – TPTZ (željezo (III)-2,4,6-tripiridil-s-triazin) u Fe^{2+} - TPTZ s antioksidansom putem SET mehanizma. Rezultat reakcije je intenzivno plavo obojenje otopine s apsorbancijom na 550 nm. FRAP je brza, jednostavna i jeftina kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje antioksidacijskog potencijala.

Priprema reagensa:

TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazin) 10 mM: odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u tikvicu od 10 mL i do oznake se nadopuni 40 mM klorovodičnom kiselinom

40 mM klorovodična kiselina (HCl): otpipetira se 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake

Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM: odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake

Acetatni pufer 0,3 M: odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u tikvicu od 1 L, otpipetira se 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni destiliranom vodom do oznake; pH pufera trebao bi iznositi 3,6

FRAP reagens (svaki puta pripremiti svježi): u tikvicu ili čašu volumena 50 mL pomiješa se s 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL Fe(III)-klorid heksahidrata u omjeru 10:1:1

Postupak određivanja:

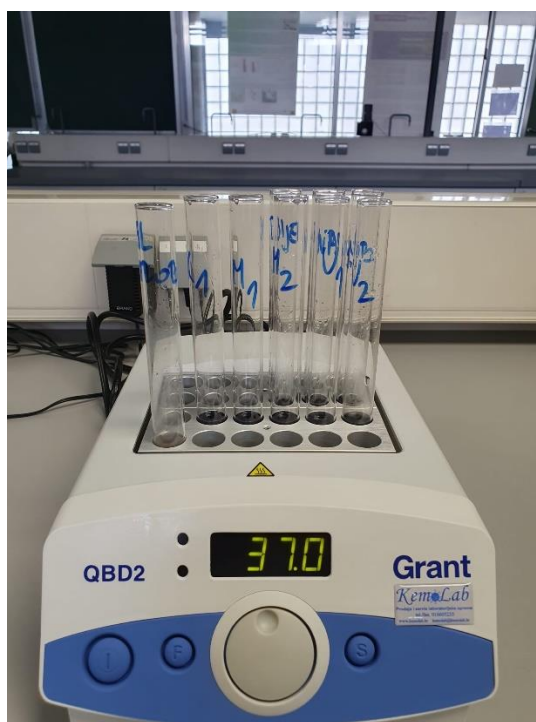
Prvo je potrebno napraviti slijepu probu. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka umjesto kojeg se dodaje otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran tj. 80 %-tni EtOH. U epruvetu dodaje se 240 μL destilirane vode, 80 μL 80 %-tnog EtOH i 2080 μL FRAP reagensa te se termostatira u

vodenoj kupelji 5 min na 37 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 593 nm. Rezultati mjerenja u konačnici su izraženi kao ekvivalent koncentracije standarda Trolox (μM).

Postupak reakcije:

U epruvetu se doda 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa te se termostatira 5 min u vodenoj kupelji na 37 °C (Slika 3.5.5.1.). Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm, u odnosu na slijepu probu.

Za izračunavanje koncentracije (u mM željezo(II)-sulfat heptahidrata ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)) prema baždarnom pravcu potrebno je oduzeti apsorbanciju slijepa probe od apsorbancije uzoraka te tako dobivenu razliku apsorbancija koristiti za preračunavanje prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 3.5.5.1. Termostacija u vodenoj kupelji

Autor: Krilić M., 2024.

Postupak izrade baždarnog pravca za FRAP metodu:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Zatim se u epruvete redom otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih tikvica i 2080 μL FRAP

reagensa. Reakcije se pomiješaju i temperiraju 5 minuta na 37 °C te se apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

3.6. Određivanje boje ekstrakata stolisnika

Određivanje boje ekstrakata stolisnika provedeno je u Laboratoriju za analizu kvalitete poljoprivrednih proizvoda biljnog porijekla, Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

Boja ekstrakata određena je kolorimetrom (PCE-CSM2, PCE Instruments UK Ltd.) po CIELAB metodi. Ovom metodom se energija iz uzorka, pomoću filtera, pretvara u fizikalnu funkciju, odnosno boju. Kolorimetar je fotolektrični tristimulusni uređaj što znači da se boje na njemu opisuju pomoću tri brojučane vrijednosti: L^* , a^* i b^* .

Vrijednost L^* (engl. *luminosity*) predstavlja doživljaj jasnoće boje u oku odnosno intenzitet svjetla ili tame. Ukoliko je vrijednost $L^* = 0$ tada nema refleksije svjetlosti što odgovara crnoj boji, dok je kod $L^* = 100$ potpuna refleksija koja odgovara bijeloj boji.

Vrijednost a^* označava intenzitet crvene ili zelene boje; negativne vrijednosti ($-a^*$) ukazuju na prisutnost zelene boje, dok pozitivne vrijednosti ($+a^*$) ukazuju na prisutnost crvene boje.

Vrijednost b^* označava intenzitet žute ili plave boje; negativne vrijednosti ($-b^*$) ukazuju na prisutnost plave boje, a pozitivne vrijednosti ($+b^*$) ukazuju na prisutnost žute boje.

3.7. Statistička obrada podataka

Nakon provedenog istraživanja, dobiveni podatci statistički su obrađeni jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) u programskom paketu SAS (SAS Institute, 2004), dobivene prosječne vrijednosti uspoređene su pomoću *post hoc* Tukey-evog testa.

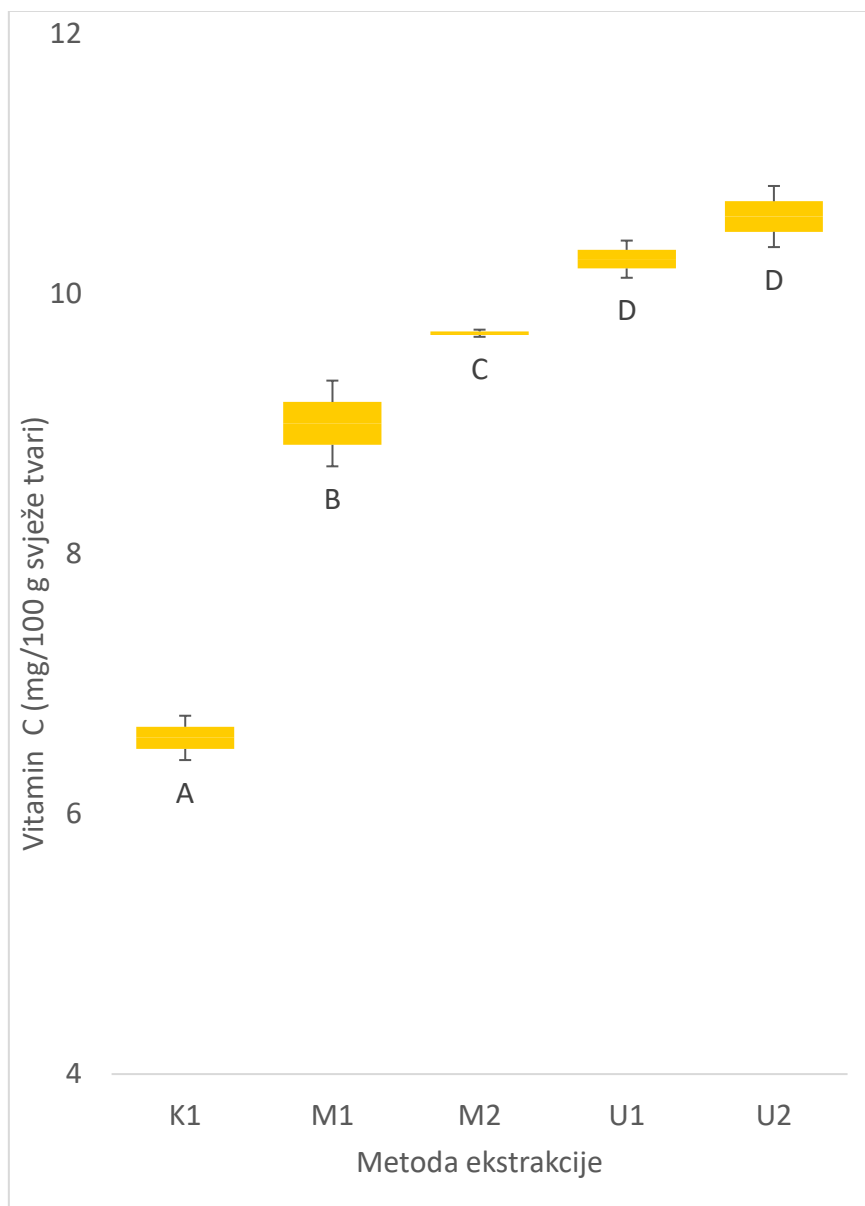
4. Rezultati i rasprava

4.2. Sadržaj vitamina C

Vitamin C (askorbinska kiselina) jedan je od najbitnijih vitamina čija uloga je usko povezana s imunološkim sustavom. Topljiv je u vodi, a njegova glavna funkcija je antioksidacijsko djelovanje pri kojem direktno inaktivira slobodne radikale. Takvo djelovanje posebno je važno u prevenciji razvoja različitih bolesti, a ponajviše onih kancerogenih (Carr i Maggini, 2017).

Utvrđene su statistički značajne razlike u sadržaju vitamina C između različitih metoda ekstrakcije ($P < 0,0001$). Prosječna vrijednost sadržaja vitamina C u analiziranim ekstraktima kretala se od 6,59 mg/100 g svježe tvari kod maceracije do 10,60 mg/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta. Analizom varijance zabilježena je statistički značajna razlika u sadržaju vitamina C između maceracije i svih drugih metoda ekstrakcije. Statističkom obradom podataka također je utvrđena statistički značajna razlika između sadržaja vitamina C u ekstraktima tretiranim mikrovalovima u trajanju od 5 i 10 minuta, pri čemu je duže vrijeme ekstrakcije rezultiralo višim prosječnim vrijednostima vitamina C (10,27 mg/100 g svježe tvari). Sadržaj vitamina C između različitog vremena trajanja ultrazvučno potpomognute ekstrakcije nije se značajno razlikovao (grafikon 4.1.1.).

U znanstvenoj literaturi nisu dostupni podaci o sadržaju vitamina C kod ekstrakata stolisnika koji bi bili usporedivi s rezultatima ovog istraživanja. Istraživane su neke srodne vrste, npr. *Achillea nobilis* L. kod koje je utvrđen sadržaj vitamina C (20,70 g /100 g svježe tvari) Dok je u istraživanju sadržaja vitamina C u ekstraktima biljaka iz porodice Asteraceae najniži sadržaj vitamina C zabilježen kod vrste *Echinacea purpurea* (L.) Moench (3,38 g /100 g svježe tvari) (Güneş i sur., 2019).



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

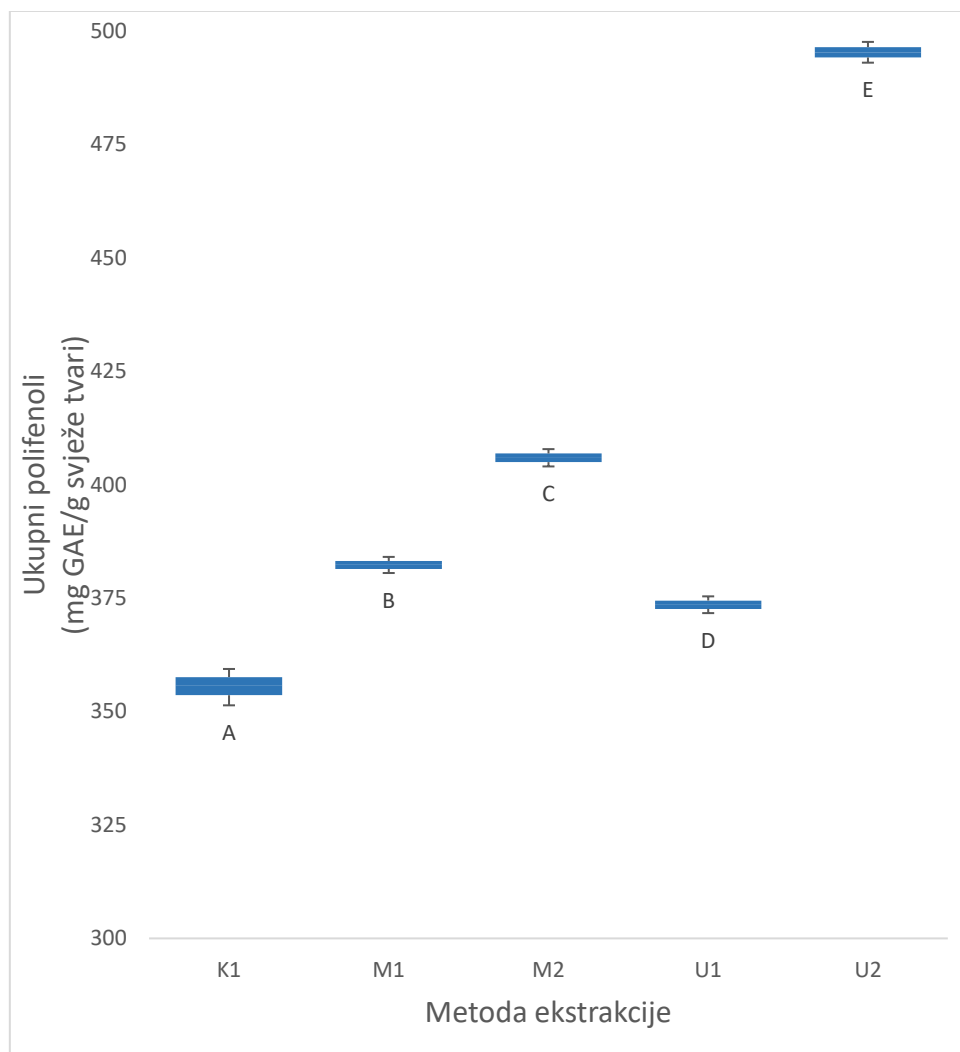
Grafikon 4.1.1. Sadržaj vitamina C u ekstraktima stolisnika

4.2. Sadržaj ukupnih polifenola

Polifenoli predstavljaju jednu od glavnih skupina sekundarnih metabolita biljaka, a kao što je već prethodno spomenuto, oni čine i jednu od najzastupljenijih skupina kemijskog

sastava stolisnika. Njihova prisutnost povezuje se s brojnim pozitivnim učincima na ljudski organizam i zdravlje, a najvažnije djelovanje od svih jest ono antioksidacijsko. Naime, polifenoli inaktiviraju slobodne radikale te time preveniraju razvoj brojnih bolesti (Zainol i sur., 2003; Ali i sur., 2017; Gorni i sur., 2021; Farasati Far i sur., 2023).

Prosječna vrijednost sadržaja ukupnih polifenola u analiziranim ekstraktima stolisnika iznosila je 355,52 mg GAE/100 g svježe tvari kod maceracije, 382,31 mg GAE/100 g svježe tvari kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju 5 minuta, 405,92 mg GAE/100 g svježe tvari kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, 373,54 mg GAE/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju 5 minuta i 495,29 mg GAE/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, gdje je značajno najmanja prosječna vrijednost zabilježena kod ekstrakta dobivenog maceracijom, a značajno najviša kod ekstrakta dobivenog ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta. Između dvaju vremena trajanja mikrovalne ekstrakcije (5 i 10 minuta) zabilježena je statistički značajna razlika te je duže vrijeme trajanja ekstrakcije rezultiralo i višim sadržajem ukupnih polifenola ($P < 0,0001$). Isto je uočeno i kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije, pri kojoj je tretman ekstrakta ultrazvučnom sondom u trajanju u 10 minuta rezultirao višim koncentracijama ukupnih polifenola (grafikon 4.2.1.).



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima stolisnika

Rezultati dostupnih istraživanja široke su varijabilnosti te pokazuju kako izbor metode ekstrakcije i otapala kojim se ekstrakcija provodi imaju veliki utjecaj na sadržaj ukupnih polifenola. Tako su Georgieva i sur. (2015) u svome istraživanju uspoređivali metode ekstrakcije stolisnika (infuzija, dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija sustavom ultrazvučne kupelji i mikrovalno potpomognuta ekstrakcija) s vodom kao otapalom te su utvrdili da je sadržaj ukupnih polifenola bio u rasponu od $2,74 \pm 0,01$ do $7,92 \pm 0,09$ mg GAE/g svježe tvari. Najniži sadržaj ukupnih polifenola bio je zabilježen kod ultrazvučne ekstrakcije sustavom ultrazvučne kupelji ($2,74 \pm 0,01$ mg GAE/ 100 g svježe tvari), dok je najviši sadržaj ukupnih polifenola zabilježen kod dekokcije ($7,92 \pm 0,09$ mg GAE/100 g svježe tvari).

Jukić i sur. (2019) proveli su istraživanje gdje su, usporedbom različitih otapala (destilirana voda,, 30 %, 50 % i 70 % etanol) kod ekstrakcijske metode maceracijom dobili rezultate koji su bili u rasponu od $85,22 \pm 0,67$ do $109,99 \pm 1,04$ mg GAE/100 g svježe tvari, s najnižim sadržajem ukupnih polifenola kod ekstrakta dobivenog vodom ($85,22 \pm 0,67$ mg GAE/100 g svježe tvari), a najvišim kod ekstrakta dobivenog u 50 %-tnom etanolu ($109,99 \pm 1,04$ mg GAE/100 g svježe tvari). Veći sadržaj ukupnih polifenola pri upotrebi etanola kao otapala zabilježili su i Villalva i sur. (2022). Koji su u svojem istraživanju zabilježili sadržaj ukupnih polifenola u etanolnom ekstraktu, dobivenom ultrazvučnom ekstrakcijom sustavom ultrazvučne sonde, od čak 3768,6 mg GAE/100 g svježe tvari.

4.3. Sadržaj flavonoida i neflavonoida

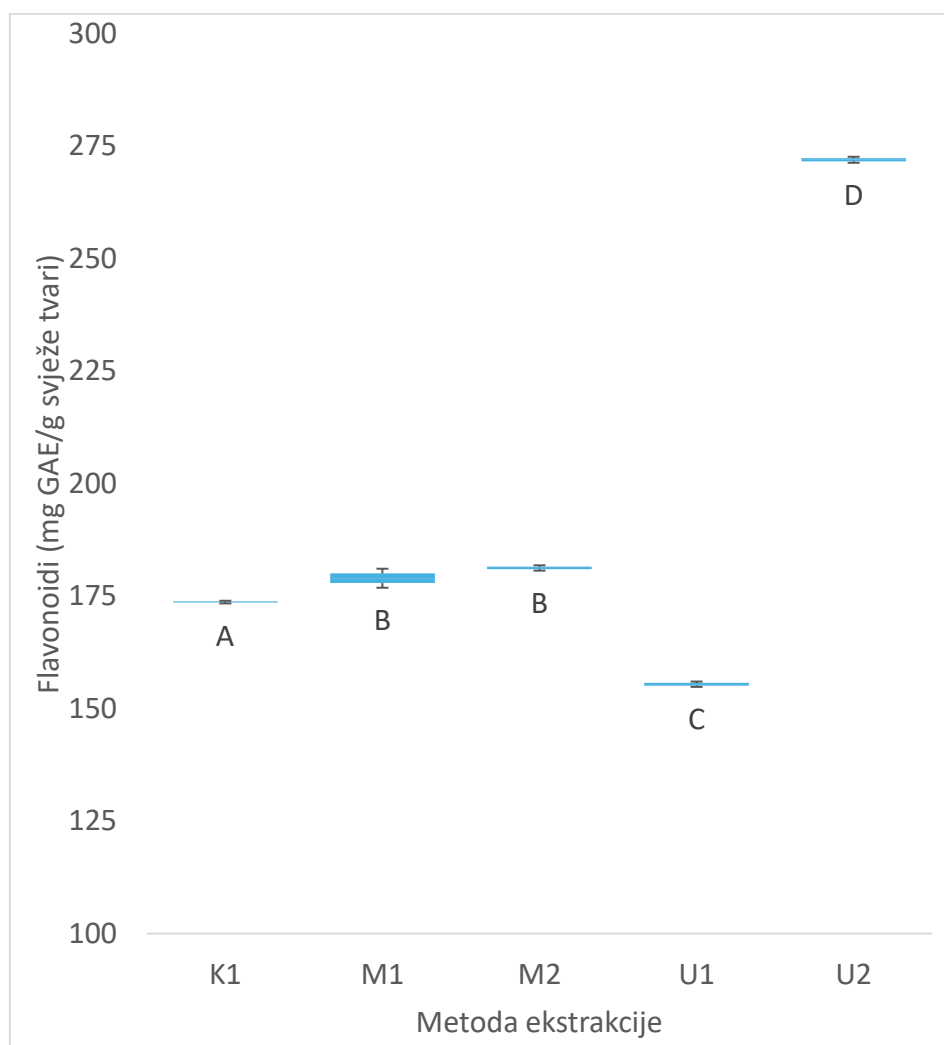
Flavonoidi pripadaju polifenolnoj skupini sekundarnih biljnih metabolita. Posjeduju brojna djelotvorna svojstva poput protuupalnog, antikancerogenog i antioksidativnog te čine jednu od glavnih kemijskih sastavnica stolisnika (Gorni i sur., 2021; Farasati Far i sur., 2023).

Prosječna vrijednost sadržaja flavonoida analiziranih ekstrakta iznosila je 173,71 mg GAE/100 g svježe tvari kod maceracije, 178,96 mg GAE/100 g svježe tvari kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, 181,24 mg GAE/100 g svježe tvari kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju 10 minuta, 155,41 mg GAE/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, što je ujedno i najmanja zabilježena vrijednost te 271,95 mg GAE/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, što je najviša zabilježena vrijednost.

U istraživanju Jukić i sur. (2019) dobiveni su rezultati sadržaja flavonoida, prilikom usporedbe različitih otapala (destilirana voda,, 30 %, 50 % i 70% etanol) kod ekstrakcijske metode maceracijom, u rasponu od $28,31 \pm 0,65$ do $35,90 \pm 0,84$ mg GAE/100 g svježe tvari. Najmanji sadržaj flavonoida zabilježen je kod maceracije vodom ($28,31 \pm 0,65$ mg GAE/100 g svježe tvari), dok je najveći sadržaj flavonoida zabilježen kod ekstrakta dobivenog ekstrakcijom u 70%-tnom etanolu ($35,90 \pm 0,84$ mg GAE/100 g svježe tvari). A Villalva i sur. (2022) su u svome istraživanju zabilježili sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu, dobivenom ultrazvučnom ekstrakcijom sustavom ultrazvučne sonde, od 2924,4 mg GAE/100 g svježe tvari.

Analizom varijance zabilježeno je postojanje značajne razlike u sadržaju flavonoida između ekstrakta dobivenog maceracijom i ekstrakata dobivenih ostalim metodama, također je zabilježena i značajna razlika između ekstrakata dobivenih mikrovalno potpomognutim ekstrakcijama i onih dobivenih ultrazvučno potpomognutim ekstrakcijama ($P < 0,0001$). Dok između ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju 5 minuta i ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta nije zabilježena značajna razlika. Između ekstrakta dobivenog ultrazvučno potpomognutom

ekstrakcijom u trajanju od 5 minuta i ekstrakta dobivenog ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju 10 minuta, utvrđena je značajna razlika (grafikon 4.3.1.).



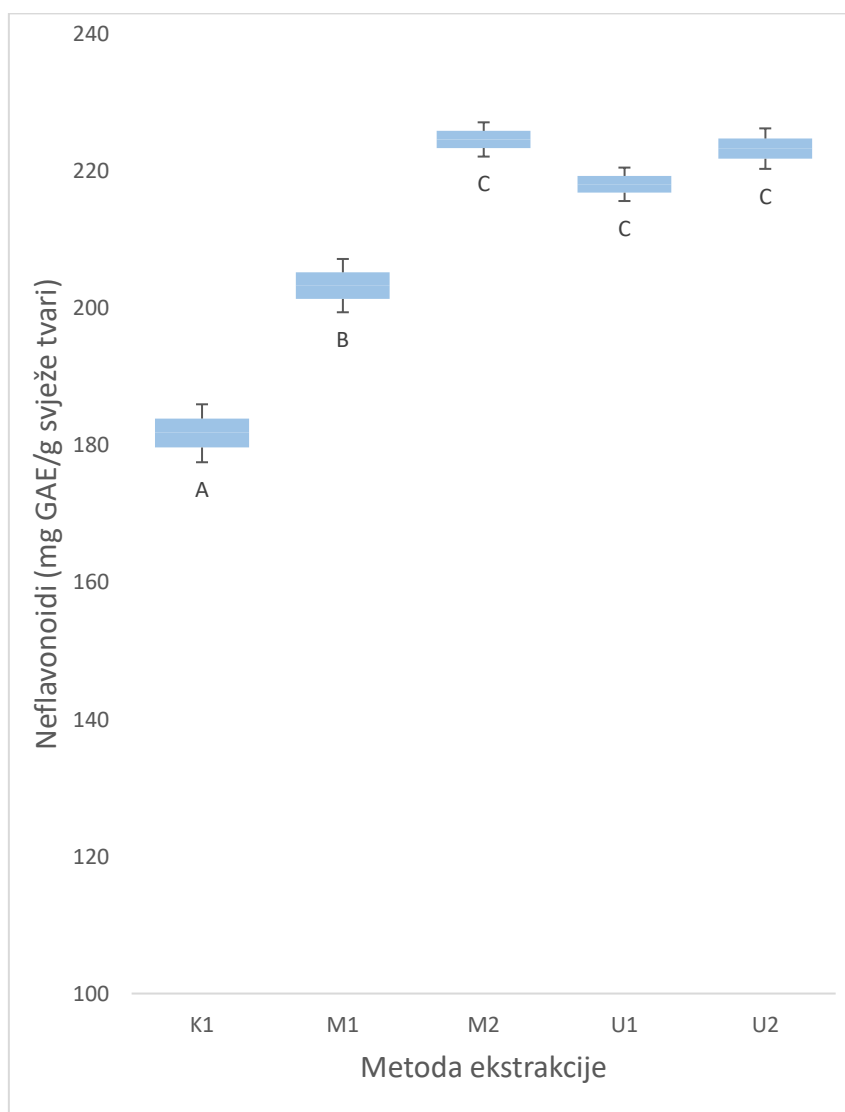
* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.3.1. Sadržaj flavonoida u ekstraktima stolisnika

Prosječna vrijednost sadržaja neflavonoida analiziranih ekstrakata iznosila je 181,81 mg GAE/100 g svježe tvari kod maceracije, što je ujedno i najmanja zabilježena vrijednost, 203,34 mg GAE/100 g svježe tvari kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, 224,68 mg GAE/100 g svježe tvari kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, što je ujedno i najveća zabilježena vrijednost, 218,13 mg GAE/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta te 223,34 mg GAE/100 g svježe tvari kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta.

Analizom varijance zabilježena je značajna razlika u sadržaju neflavonoida između ekstrakta dobivenog maceracijom i ekstrakata dobivenih ostalim metodama, kao i između ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju 5 minuta i ekstrakata dobivenih ostalim metodama ($P < 0,0001$). Dok između ekstrakata dobivenih mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta, ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 minuta i ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta nije zabilježena značajna razlika u sadržaju neflavonoida (grafikon 4.3.2.).



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

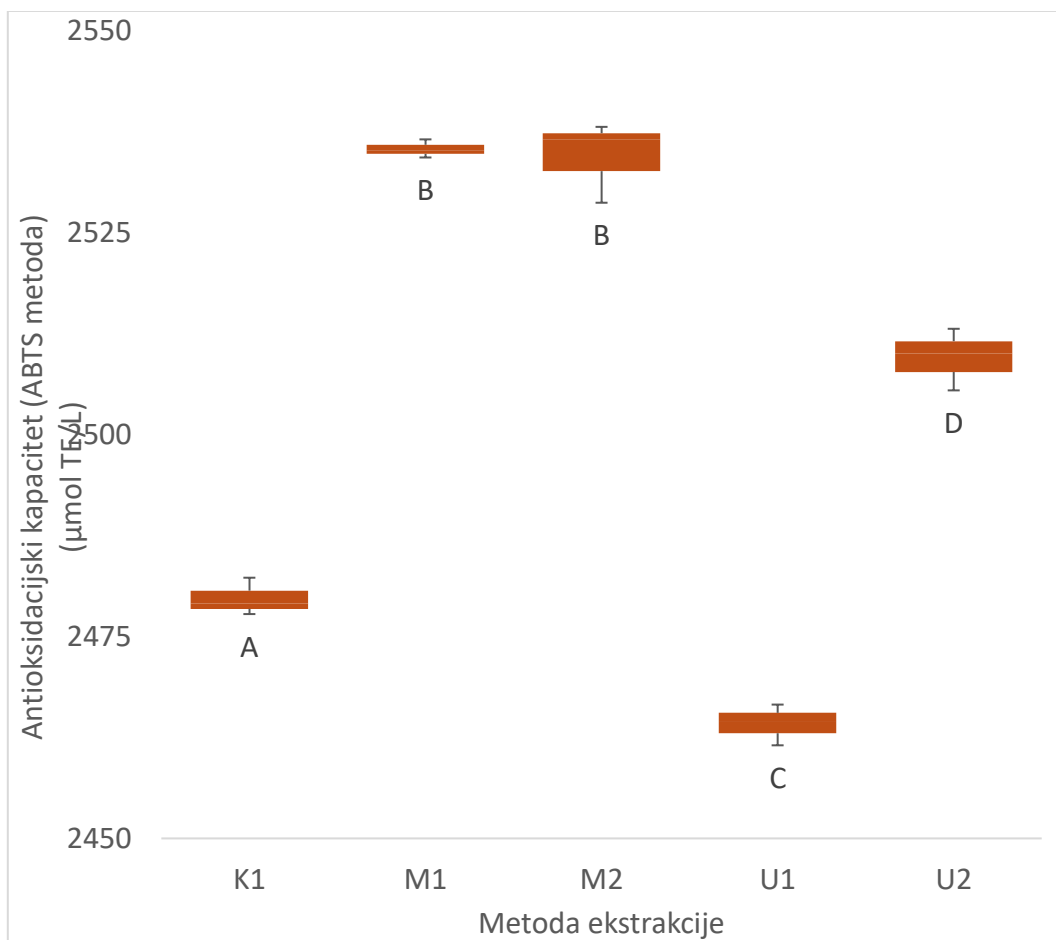
Grafikon 4.3.2. Sadržaj neflavonoida u ekstraktima stolisnika

4.4. Antioksidacijski kapacitet (ABTS metoda)

Antioksidacijski kapacitet svojstvo je povezano sa sadržajem vitamina C, polifenola i flavonoida te je njegov rast proporcionalan je rastu tih sastavnica (Gorni i sur., 2021).

Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog ABTS metodom, analiziranih ekstrakata stolisnika kretala se od 2464,20 $\mu\text{mol TE/L}$ kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta do 2535,33 $\mu\text{mol TE/L}$ kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta. Analizom varijance zabilježena je značajna razlika između antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog ABTS metodom, svih ekstrakata ($P < 0,0001$) osim između ekstrakata dobivenih mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 i 10 minuta (grafikon 4.4.1.).

Georgieva i sur. (2015) su određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom, kod različitih metoda ekstrakcije (infuzija, dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija sustavom ultrazvučne kupelji i mikrovalno potpomognuta ekstrakcija) s vodom kao otapalom, dobili rezultate u rasponu od $18,59 \pm 0,22$ do $125,75 \pm 2,24 \mu\text{M TE/100 grama svježe tvari}$. Gdje je najniži antioksidacijski kapacitet bio kod ekstrakta dobivenog tretmanom ultrazvučnom kupelji ($18,59 \pm 0,22 \mu\text{M TE/100 grama svježe tvari}$), a najveći kod dekokcije ($125,75 \pm 2,24 \mu\text{M TE/100 grama svježe tvari}$).



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.4.1. Antioksiidacijski kapacitet (ABTS metoda) ekstrakata stolisnika

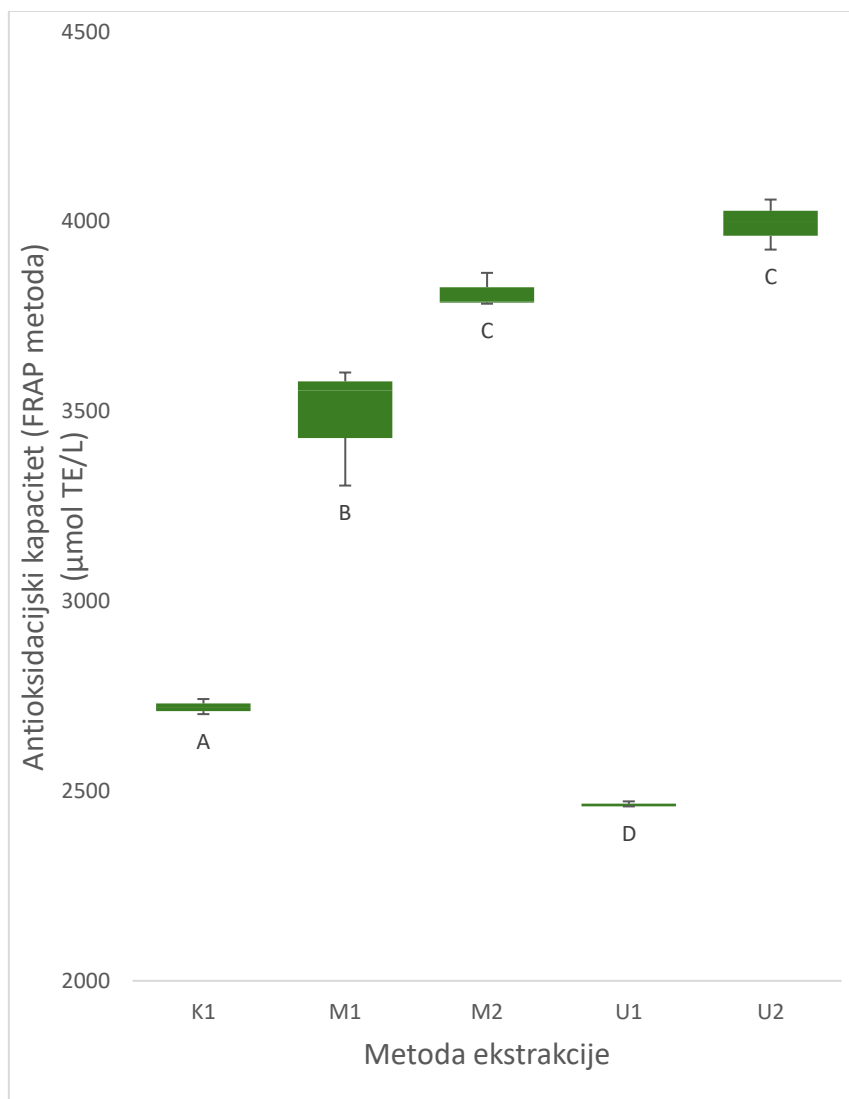
4.5. Antioksiidacijski kapacitet (FRAP metoda)

Prosječna vrijednost antioksiidacijski kapacitet, dobivenog FRAP metodom, za analizirane ekstrakte iznosila je 2721,20 μmol TE/L kod maceracije, 3487,71 μmol TE/L kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, 3812,79 μmol TE/L kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, 2464,11 μmol TE/L kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta te 3994,41 μmol TE/L kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta.

Najmanja prosječna vrijednost antioksiidacijskog kapaciteta zabilježena je kod ekstrakta dobivenog ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 minuta, dok je najveća zabilježena kod ultrazvučno potpomognutom ekstrakcije u trajanju od 10 minuta.

Analizom varijance zabilježena je značajna razlika antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog FRAP metodom, između svih ekstrakata ($P < 0,0001$), osim između ekstrakta dobivenih mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta i ekstrakta dobivenog ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta (grafikon 4.5.1.).

U istraživanjima antioksidacijskog kapaciteta dobivenog FRAP metodom, Georgieva i sur. (2015) su, usporedbom različitih metoda ekstrakcije (infuzija, dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija sustavom ultrazvučne kupelji i mikrovalno potpomognuta ekstrakcija) s vodom kao otapalom, dobili rezultate gdje je antioksidacijski kapacitet bio u rasponu $29,57 \pm 0,40$ do $132,71 \pm 1,86 \mu\text{M TE}/100$ grama svježe tvari s najnižim zabilježenim kod ekstrakta dobivenog tretmanom ultrazvučnom kupelji, a najvišim kod dekokcije. Dok su Jukić i sur. (2019), usporedbom različitih otapala (destilirana voda, 30 %, 50 % i 70 % etanol) kod ekstrakcijske metode maceracijom, dobili rezultate antioksidacijskog kapaciteta u rasponu od $10,27 \pm 0,84$ do $21,28 \pm 1,13 \mu\text{mol Trolox}/\text{mg}$. Najniži antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod ekstrakta dobivenog maceracijom vodom, a najviši je zabilježen kod ekstrakta dobivenog maceracijom u 50 %-tnom etanolu.



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

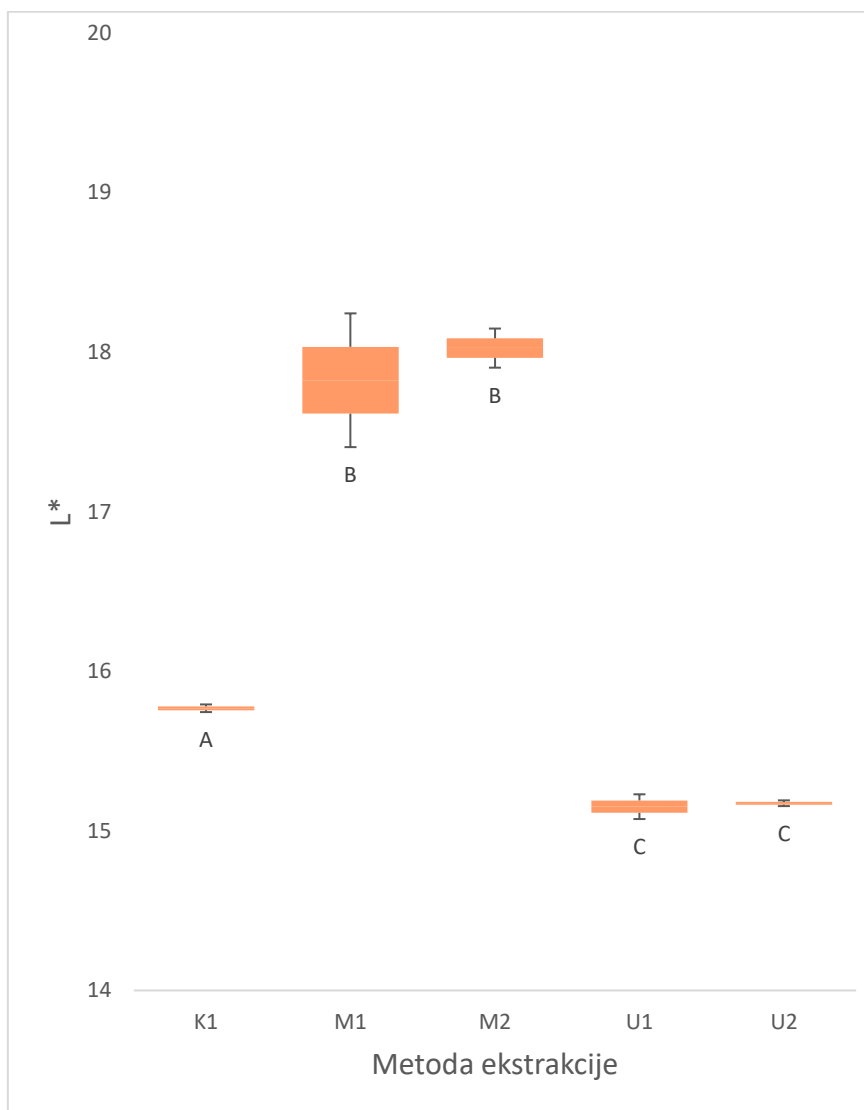
** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.5.1. Antioksidacijski kapacitet (FRAP metoda) ekstrakata stolisnika

4.6. Boja ekstrakata stolisnika

Analizom tri brojčane vrijednosti boje (L^* , a^* , b^*) dobiveni su slijedeći rezultati. Prosječna vrijednost L^* , analiziranih ekstrakata, iznosila je 15,77 kod maceracije, 17,82 kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju 5 minuta, 18,03 kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, 15,15 kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta te 15,17 kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u

trajanju od 10 minuta. Najmanja prosječna vrijednost zabilježena je kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, dok je najveća zabilježena kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta. Najviše vrijednosti parametra L upućuju na činjenicu da je ekstrakt dobiven ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta bio najsvjetliji.



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

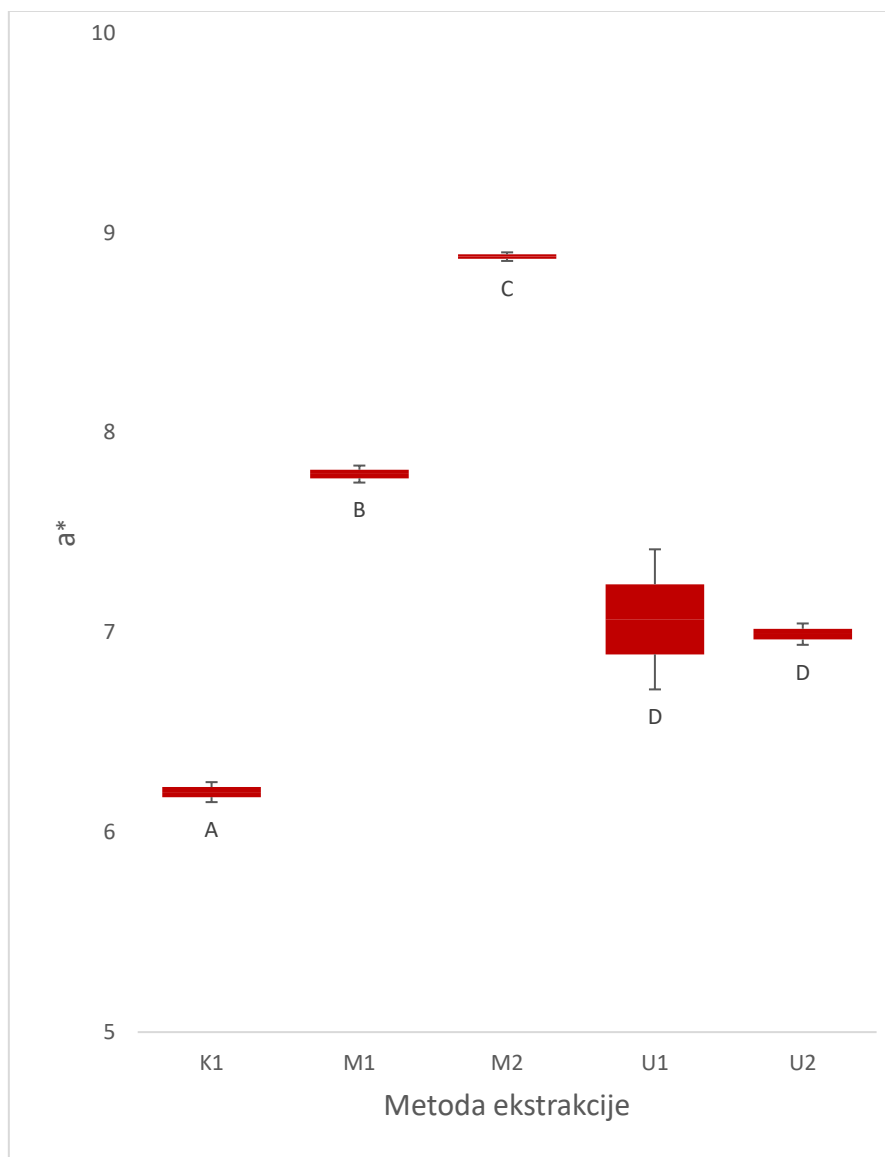
** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.6.1. Vrijednost boje L* ekstrakata stolisnika

Prosječna vrijednost a* u analiziranim ekstraktima stolisnika, iznosila je 6,20 kod maceracije, 7,79 kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, 8,88 kod

mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, 7,07 kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta te 6,99 kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta. Najmanja prosječna vrijednost zabilježena je kod ekstrakta dobivenog maceracijom, a najveća kod ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta.

Analizom varijance utvrđena je značajna razlika između svih analiziranih ekstrakata ($P < 0,0001$), osim između ekstrakata dobivenih ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 i 10 minuta (grafikon 4.6.2.).



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

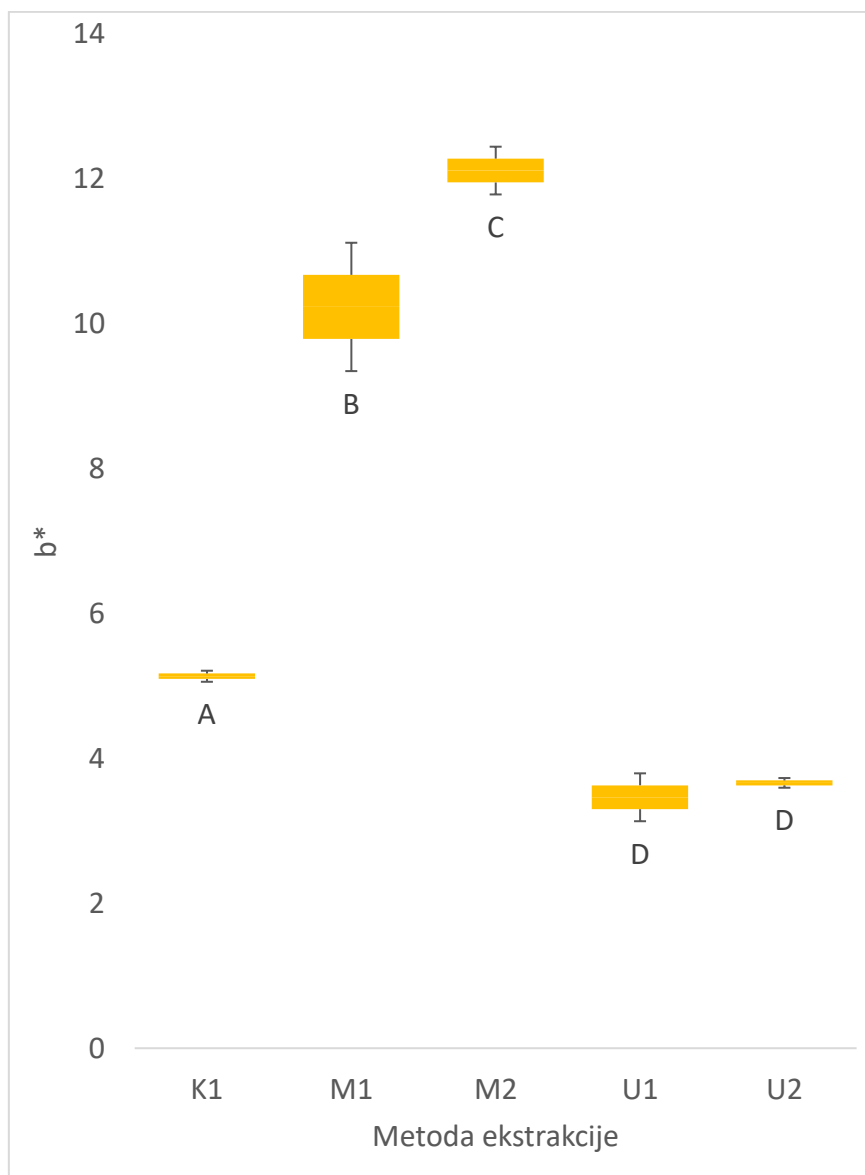
** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.6.2. Vrijednost boje a* ekstrakata stolisnika

Prosječna vrijednost b* u analiziranim ekstraktima stolisnika iznosila je 5,14 kod maceracije, 10,23 kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, 12,12 kod mikrovalno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, 3,47 kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 5 minuta te 3,66 kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije u trajanju od 10 minuta. Najmanja prosječna vrijednost zabilježena je kod ekstrakta dobivenog ultrazvučnom potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 minuta, dok je najveća

zabilježena kod ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta.

Analizom varijance zabilježena je između svih analiziranih ekstrakata ($P < 0,0001$), osim između ekstrakata dobivenih ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 i 10 minuta (grafikon 4.6.3.).



* K1-maceracija; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; M2-mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min; U1-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 5 min; U2-ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 min

** vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0,0001$

Grafikon 4.6.3. Vrijednost boje b* ekstrakata stolisnika

Vizualnom inspekcijom, boje različitih ekstrakata, nisu se znatno razlikovale te su svi ekstrakti bili tamno narančasto-smeđe boje što je i uočljivo pregledom rezultata L^* , a^* , b^* varijabli, gdje između sve tri varijable ne postoje značajne razlike. Kako različiti kemijski spojevi posjeduju određenu boju u čistom ekstraktu, bilo je očekivano da će njihova mješavina rezultirati ekstraktom smeđe boje te na temelju ovih rezultata ne možemo boju ekstrakta (ili jednu od njenih sastavnica) uzimati kao pokazatelj neke od mjerenih varijabli.

Prema mojim saznanjima trenutačno u dostupnoj literaturi ne postoje istraživanja na stolisniku s kojima bi se dobivene brojčane vrijednosti boje L^* , a^* , b^* mogle usporediti.

4.7. Analiza praha stolisnika

Usitnjeni suhi biljni materijal, najdostupniji je komercijalni oblik stolisnika. On se također koristi kao početna sirovina za izradu ljekovitih ekstrakata, poput uvaraka i tinktura, koji su najčešći oblici primjene ove ljekovite vrste (Gorni i sur., 2021). Zato je u ovome radu, osim analize ekstrakata dobivenih različitim metodama ekstrakcije, analiziran i početni biljni materijal (prah stolisnika), kako bi se utvrdio njegov sadržaj bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet prije podvrgavanja ekstrakcijskim metodama.

Analizom sadržaja bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta praha stolisnika, dobiveni su slijedeći rezultati: prosječna vrijednost sadržaja vitamina C iznosila je 45,56 mg/100 g svježe tvari, prosječna vrijednost ukupnih polifenola iznosila je 1327,3 mg GAE/100 g svježe tvari, prosječna vrijednost sadržaja flavonoida iznosila je 563,77 GAE/100 g svježe tvari, dok je kod neflavonoida iznosila 763,54 GAE/100 g svježe tvari, prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog ABTS metodom, iznosila je 2525,42 $\mu\text{mol TE/L}$, a ona dobivena FRAP metodom je iznosila 4388,58 $\mu\text{mol TE/L}$.

Iako je provedena analiza praha stolisnika, rezultati su statistički neusporedivi s onima dobivenim analizom ekstrakata, a također prema mojim saznanjima u dostupnoj literaturi ne postoje rezultati s kojima bi rezultati dobiveni u ovome istraživanju mogli biti usporediti. Neovisno o navedenom, a s obzirom na dobivene rezultate, valja posebno istaknuti kako su za prah stolisnika utvrđene vrlo visoke vrijednosti ukupnih polifenolnih spojeva kao i vrlo visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta što ponovno ovu biljnu vrstu može istaknuti kao biljni materijal potencijalno brojnih funkcionalnih svojstava i blagodati za ljudsko zdravlje.

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je slijedeće:

1. Najveća prosječna vrijednost sadržaja vitamina C (10,60 mg/100 g svježe tvari), ukupnih polifenola (495,29 mg GAE/100 g svježe tvari) i flavonoida (271,95 mg GAE/100 g svježe tvari) zabilježena je kod ekstrakata dobivenih ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta.
2. Najveća prosječna vrijednost sadržaja neflavonoida zabilježen kod ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta i iznosila je 224,68 mg GAE/100 g svježe tvari.
3. Najveća prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog ABTS metodom, zabilježen je kod ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 5 minuta i iznosila je 2535,33 $\mu\text{mol TE/L}$.
4. Najveća prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta, dobivenog FRAP metodom, zabilježen je kod ekstrakta dobivenog ultrazvučno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta i iznosila je 3994,41 $\mu\text{mol TE/L}$.
5. Najveća prosječna vrijednost svih triju brojčanih vrijednosti boje zabilježena je kod ekstrakta dobivenog mikrovalno potpomognutom ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta. Za vrijednost L^* iznosila je 18,03, za vrijednost a^* 8,88, a za vrijednost b^* 12,12.
6. Različite ekstrakcijske metode uvelike utječu na sadržaj bioaktivnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta. Od metoda istraživanih u ovome radu, najbolje rezultate dale su ultrazvučno i mikrovalno potpomognuta ekstrakcija u trajanju od 10 minuta. Obije istaknute metode ekološki su prihvatljive, a kako bi polučile još bolje rezultate valja ih optimizirati.
7. Stolisnik i njegovi pripravci, poput ekstrakata, predstavljaju bogat izvor vitamina C, polifenola i flavonoida s visokim antioksidacijskim djelovanjem, čime ovu biljnu vrstu možemo istaknuti kao biljni materijal potencijalno brojnih funkcionalnih svojstava kao i vrstu čija upotreba ima brojne blagodati za ljudsko zdravlje.

6. Popis literature

1. Akram M. (2013). Minireview on *Achillea millefolium* Linn. J Membr Biol 246 (9):661-663.
2. Alcántara C., Žugčić T, Abdelkebir R., García-Pérez J. V., Jambrak A. R., Lorenzo J. M., Collado M. C., Granato D., Barba F. J. (2020). Effects of Ultrasound-Assisted Extraction and Solvent on the Phenolic Profile, Bacterial Growth, and Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities of Mediterranean Olive and Fig Leaves Extracts. Molecules 25 (7):1718.
3. Al-Ezzy R. M., Al Anee R. S., Kathum O. A. (2017). Hepatoprotective effects of *Achillea millefolium* methanolic extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity on albino male mice. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 4 (8): 98 – 109.
4. Ali S. I., Gopalakrishnan B., Venkatesalu V. (2017). Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. Phytother Res (8): 1140 – 1161.
5. Allen D. E, Hatfield G. (2004). Medicinal Plants in Folk Tradition. Timber Press: Portland, Oregon.
6. Andrade M. A., Barbosa C. H., Shah M. A., Ahmad N., Vilarinho F., Khwaldia K., Silva A. S., Ramos F. (2023.). Citrus By-Products: Valuable Source of Bioactive Compounds for Food Applications. Antioxidants 12 (1): 38.
7. Anne O., Elmar A., Ain R. (2006). Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European countries. Nat Prod Res 20: 1082 – 1088.
8. Anne O., Tiiu K., Kaire L. (2001). Composition of the essential oil from *Achillea millefolium* L. from Estonia. J Essent Oil Res 13: 290 – 294.
9. Applequist W. L., Moerman D. E. (2011). Yarrow (*Achillea millefolium* L.): a neglected panacea? A review of ethnobotany, bioactivity and biomedical research. Econo Bot 65: 209 – 225.
10. Baggio H. C., Otofujii G. D. M., Freitas C. S., Torres L. M. B., Marques M. C. A, Vela S. M. (2008). Brazilian medicinal plants in gastrointestinal therapy. In Botanical Medicine in Clinical Practice. CABI: Oxon, United Kingdom; 46 – 51.
11. Benedek B, Kopp B, Melzig MF. (2007a). *Achillea millefolium* - is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibitors? J Ethnopharmacol 113: 312 – 317.
12. Benedek B., Gjoncaj N., Saukel J., Kopp B. (2007b.). Distribution of phenolic compounds in Middle European Taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. Chem Biodivers 4: 849 – 857.
13. Benetis R., Radusiene J., Janulis V. (2008). Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania. Medicina 44: 774 – 781.

14. Bezić N., Skocibusić M., Dunkić V., Radonić A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytother Res* 17 (9): 1037 – 1040.
15. Bimbiraite K., Ragazinskiene O., Maruska A., Kornysova O. (2008). Comparison of the chemical composition of four yarrow (*Achillea millefolium* L.) morphotypes. *Biologija* 54: 208 – 212.
16. Blumenthal M., Busse W. R., Goldberg A., Gruenwald J., Hall T., Klein S., Riggins C. W., Rister R. S. (1998). The complete German commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. American Botanical Council, Austin, Texas.
17. Borrelli F., Romano B., Fasolino I., Tagliatela-Scafati O., Aprea G., Capasso R., Capasso F., Coppola Bottazzi E., Izzo A. A. (2012). Prokinetic effect of a standardized yarrow (*Achillea millefolium*) extract and its constituent choline: studies in the mouse and human stomach. *Neurogastroenterol Motil* 24: 164 – 171.
18. Boskovic Z., Radulović N., Stojanović G. (2005). Essential oil composition of four *Achillea* species from the balkans and its chemotaxonomic significance. *Chemi Nat Comp* 41: 555 – 558.
19. Brachet A., Christen P., Veuthey J. L. (2002). Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem* 13: 162 – 169.
20. Bussmann R. W., Sharon D., Vandebroek I., Jones A., Revene Z. (2007). Health for sale: the medicinal plant markets in Trujillo and Chiclayo, Northern Peru. *J Ethnobiol Ethnomed* 3: 37.
21. Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *A. millefolium*. *J Ethnopharmacol* 87: 215 – 220.
22. Carr A. C., Maggini S. (2017). Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* 9 (11): 1211.
23. Chávez-Silva F., Cerón-Romero L., Arias-Durán L., Navarrete-Vázquez G., Almanza-Pérez J., Román-Ramos R., Ramírez-Ávila G., Perea-Arango I., Villalobos-Molina R., Estrada-Soto S. (2018). Antidiabetic effect of *Achillea millefolium* through multitarget interactions: α -glucosidases inhibition, insulin sensitization and insulin secretagogue activities. *J Ethnopharmacol* 212: 1 – 7.
24. Conti B., Canale A., Bertoli A., Gozzini F., Pistelli L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 107: 1455 – 1461.
25. Costescu C. I., Radoi B. P., Hadaruga N. G., Gruia A. T., Riviş A., Pârvu D., David I, Hădărugă D. I. (2014). Obtaining and characterization of *Achillea millefolium* L. extracts. *J Agroalimnet Proc Technol* 20: 142 – 149.
26. Csupor-Löffler B., Hajdú Z., Zupkó I., Réthy B., Falkay G., Forgo P., Hohmann J. (2009). Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. *Phytother Res* 23 (5) :672 – 676.

27. Ćujić N., Savikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem* 194: 135 – 142.
28. Cvetanović A., Uysal S., Pavlić B., Sinan K. I., Llorent-Martínez E. J., Zengin G. (2020). *Tamarindus indica* L. seed: Optimization of maceration extraction recovery of tannins. *Food Anal Methods* 13 (3): 579 – 590.
29. Dent M., Dragovic-Uzelac V., Garofulic I. E., Bosiljkov T., Jezek D., Brncic M. (2015). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem Biochem Eng Q* 29 (3): 475 – 484.
30. Ebadollahi A., Sendi J.J , Razmjou J. (2016). Toxicity and phytochemical profile of essential oil from Iranian *Achillea millefolium* L. against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Toxin Rev* 35:24 – 28.
31. El-Kalamouni C., Venskutonis P. R., Zebib B., Merah O., Raynaud C., Talou T. (2017). Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France. *Medicines (Basel)* 4 (2): 30.
32. Eskilsson C. S., Björklund E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A*. 902 (1):227 – 250.
33. Falconieri D., Piras A., Porcedda S., Marongiu B., Gonçalves M. J., Cabral C., Cavaleiro C., Salgueiro L. (2011). Chemical composition and biological activity of the volatile extracts of *Achillea millefolium*. *Nat Prod Commun* 6(10):1527 – 30.
34. Falk A. J., Smolenski S. J., Bauer L., Bell C. L. (1975). Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. *J Pharm Sci* 64: 1838 – 1842.
35. Farasati Far B., Behzad G., Khalili H. (2023). *Achillea millefolium*: Mechanism of action, pharmacokinetic, clinical drug-drug interactions and tolerability. *Heliyon* 9 (12).
36. Fierascu I., Ungureanu C., Avramescu S. M., Fierascu R. C., Ortan A., Soare L. C., Paunescu A. (2015). In vitro antioxidant and antifungal properties of *Achillea millefolium* L. *Rom Biotech Lett* 20: 10626 – 10636.
37. Font N., Hernandez F., Hogendoorn E. A., Baumann R. A., van Zoonen, P. (1998). Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J. Chrom. A* 798: 179 – 186.
38. Fraisse D., Felgines C., Texier O., Lamison J. L. (2011). Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. *Food Nutr Sci* 2: 181 – 192.
39. Fu C., Tian H., Li Q., Cai T., Du W. (2006). Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrason Sonochem.* 13: 511 – 516.
40. Gadgoli C., Mishra S. H. (2007). Antihepatotoxic activity of 5-hydroxy 3, 40, 6, 7-tetramethoxy flavone from *Achillea millefolium*. *Pharmacologyonline* 1: 391 – 399.

41. Georgieva L.D., Gadjalova A.V., Mihaylova D., Pavlov A. (2015). *Achillea millefolium* L. - phytochemical profile and *in vitro* antioxidant activity. International food research journal 22: 1347 – 1352.
42. Gorni P. H., Pacheco A. C., Lima Moro A., Albuquerque Silva J.F., Moreli R. R., de Miranda G. R., Pelegrini J. M., Baptista Zaniboni C., Daleck Spera K., Gonçalves da Silva R. M. (2021). Elicitation Improves the Leaf Area, Enzymatic Activities, Antioxidant Activity and Content of Secondary Metabolites in *Achillea millefolium* L. Grown in the Field. J Plant Growth Regul 40: 1652 – 1666.
43. Greger H. (1969). Flavonoide und Systematik der Anthemideae. Naturwissenschaften 56: 467 – 468.
44. Guédon D., Abbe P., Lamaison J. L. (1993). Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies. Biochem Syst Ecol 21: 607 – 611.
45. Güneş A., Kordali Ş., Turan M., Usanmaz Bozhüyük A. (2019). Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. Industrial Crops and Products 137: 208 – 213.
46. Haidara K., Zamir L., Shi Q. W, Batist G. (2006). The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. Cancer Lett 242: 180 – 190.
47. Hofmann L., Fritz D., Nitz S., Kollmannsberger H., Drawert F. (1992). Oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* Complex. Phytochemistry 31: 537 – 542.
48. Horhammer L. (1961). Ober den qualitativen und quantitativen Flavongehalt von Arzneipflanzen im Hinblick auf ihre spasmolytische Wirkung. Congr Sci Farm Conf Commun 21: 578 – 588.
49. Horhammer L., Farkas L., Wagner H., Ostermayer J. (1964). Isolierung des Luteolin-7-glucosids aus *Achillea millefolium* L. und eine neue Synthese des Glucosids. Acta Chim Hung 40: 463 – 469.
50. Hossain M. B., Brunton N. P., Patras A., Tiwari B., O'Donnell C. P., Martin Diana A. B., Barry-Ryan C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. Ultrason Sonochem 19 (3): 582 – 590.
51. Hulina N. (1998). Korovi. Školska knjiga. Zagreb. 72, 142 – 143.
52. Innocenti G., Vegeto E., Dall'Acqua S., Ciana P., Giorgetti M., Agradi E., Sozzi A., Fico G., Tomè F. (2007). *In vitro* estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. Phytomedicine 14 (2-3): 147 – 152.
53. Ivancheva S., Tomas-Barberan F., Tsvetkova R. (2002). Comparative analysis of flavonoids in *Achillea* sp. sect. millefolium and sect. ptarmica. Compt Rend L'Acad Bulgare Sci 55:43 – 46.
54. Jaimand K., Rezaee M. B., Mozaffarian V. (2006). Chemical constituents of the leaf and flower oils from *Achillea millefolium* ssp. from Iran rich in Chamazulene. J Essent Oil Res 18: 293 – 295.

55. Judzentiene A. (2016). A typical chemical profiles of wild yarrow (*Achillea millefolium* L.) essential oils. *Rec Nat Prod* 10: 262 – 268.
56. Judzentiene A., Mockute D. (2010). Essential oil composition of two yarrow taxonomic forms. *Cent Eur J Biol* 5: 346 – 352.
57. Jukić H., Dedić S., Džaferović, A. (2019). Determination of antioxidant activity and phenolic content in aqueous and ethanol-aqueous extracts (*Achillea millefolium*). *Zbornik radova*, 79. 13. međunarodni znanstveno-stručni skup Hranom do zdravlja 16. i 17. 09. 2021., Osijek, Hrvatska.
58. Kaloshina N. A., Neshta D. I. (1973). Flavonoids of *Achillea millefolium*. *Chem Nat Compd* 9: 261.
59. Kaufmann B., Christen P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem* 13: 105 – 113.
60. Kazemi M. (2015). Phytochemical and antioxidant properties of *Achillea millefolium* from the eastern region of Iran. *Int J Food Prop* 18: 2187 – 2192.
61. Keser S., Celik S., Turkoglu S., Yilmaz O., Turkoglu I. (2013). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *Achillea millefolium* L. *Turk J Pharm Sci* 10: 385 – 392.
62. Lazarevic J., Radulović N., Zlatković B, Palic R. (2010). Composition of *Achillea distans* Willd. subsp. *distans* root essential oil. *Nat Prod Res* 24: 718 – 731.
63. Leroi G.A. (1975).The flowers found with Shanidar IV,a Neanderthal burial in Iraq. *Science* 190: 562 – 564.
64. Li Y., Ni Z. Y., Zhu M. C. (2012). Millifolides A–C. New 1, 10 seco-guaianolides from the flowers of *Achillea millefolium*. *Z Naturforsch* 67: 438 – 446.
65. Li Y., Zhang M. L., Cong B., Wang S. M., Dong M., Sauriol F., Huo C. H., Shi Q. W., Gu Y. C., Kiyota H. (2011). Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75 (8): 1554 – 1556.
66. Lourenco P. M. L., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., Oliveira M. M., Deans S. G., Scheffer J. J. C. (1999). Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. *Phytochemistry* 51: 637 – 642.
67. Luque de Castro M. D., Priego-Capote F. (2007). *Analytical Applications of Ultrasound*. Elsevier Science, Amsterdam.
68. Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews* 1 (1): 7 – 18.
69. Mazandarani M., Mirdeilami S. Z., Pessarakli M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. *J Medi Plant Res* 7: 1063 – 1069.

70. Miraldi E., Ferri S., Mostaghimi V. (2001). Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *J Ethnopharmacol* 75: 77 – 87.
71. Mollasalehi S., Kashefi B., Hashemi-moghaddam H. (2013). Comparison of Microwave-Assisted and Hydrodistillation Methods for Extraction of Essential Oil from *Achillea millefolium*. *Journal of Chemical Health Risks* 3 (2) : 39 – 46.
72. Monton C., Settharaksa S., Luprasong C., Songsak T. (2019). An optimization approach of dynamic maceration of *Centella asiatica* to obtain the highest content of four centelloids by response surface methodology. *Rev Bras Farmacogn* 29 (2): 254 – 261.
73. Mouhid L., Gómez de Cedrón M., Vargas T., García-Carrascosa E., Herranz N., García-Risco M., Reglero G., Fornari T., Ramírez de Molina A. (2018). Identification of antitumoral agents against human pancreatic cancer cells from Asteraceae and Lamiaceae plant extracts. *BMC Complement Altern Med* 18 (1): 254.
74. Nadim M. M., Malik A. A., Ahmad J., Bakshi S. K. (2011). The essential oil composition of *Achillea millefolium* cultivated under tropical condition in India. *W J Agri Sci* 7: 561–565.
75. Nemeth E. (2005). Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. *J Essent Oil Res* 17: 501 – 512.
76. Neshta I. D., Kaloshina N. A., Zapesochayaya G. G., Ban'kovskii A. I. (1972). Rutin from *Achillea millefolium*. *Chem Nat Compd* 8: 664.
77. Osbaldeston T. A., Wood R. P. A. (2000). *Dioscorides: De Materia Medica*. Ibis Press: Johannesburg.
78. Oswiecimska M., Miedzobrodzka J. (1966). Flavonoid compounds in the polyploidal complex of *Achillea millefolium*. *Diss Pharm Pharmacol* 18: 601 – 606.
79. Pires J. M., Mendes F. R., Negri G., Duarte-Almeida J. M., Carlini E. A. (2009). Antinociceptive peripheral effect of *A. millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. *Phytother Res* 23: 212 – 219.
80. Rahimmalek M., Tabatabaei S. B. E., Etemadi N., Goli S. A. H., Arzani A., Zeinali H. (2009). Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. *Ind Crops Prod* 29: 348 – 355.
81. Rohloff J., Skagen E.B., Steen A.H., Iversen T.H. (2000). Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality. *J Agric Food Chem* 48: 6205 – 6209.
82. Romero B. A., Bou-Maroun E., Reparet J. M., Blanquet J., Cayot N. (2010). Impact of lipid extraction on the dearomatisation of an *Eisenia foetida* protein powder. *Food Chem* 119 (2): 459 – 466.
83. Santoro G. F., Cardoso M. G., Guimaraes L. G., Mendonça L. Z., Soares M. J. (2007). *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium*

- aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 116: 283 – 290.
84. Sayed A., Bano H. (2018). Brinjasif (*Achillea millefolium* Linn): an efficacious unani medicine. *Int J Herb Med* 6: 25 – 28.
85. Schulz H., Albroscheit G. (1988). High-performance liquid chromatographic characterization of some medical plant extracts used in cosmetic formulas. *J Chromatogr* 442: 353 – 361.
86. Sevindik E., Abaci Z. T., Yamaner C., Ayvaz M. (2016). Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Teucrium polium* and *Achillea millefolium* grown under North Anatolian ecological conditions. *Biotechnol Biotechnol Equip* 30: 375 – 380.
87. Sharma P. K., Chauhan N. S., Lal B. (2004). Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parvati valley in western Himalaya, India. *J Ethnopharmacol* 92: 167 – 176.
88. Solecki R. S. (1975). Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 190: 880 – 881.
89. Tajik H., Jalali F. S. S., Sobhani A., Shahbazi Y., Zadeh M. S. (2008). *In vitro* assessment of Antimicrobial efficacy of alcoholic extract of *Achillea millefolium* in comparison with Penicillin derivatives. *J Anim Vet Adv* 7: 508 – 511.
90. Tunón H., Thorsell W., Bohlin L. (1994). Mosquito repelling activity of compounds occurring in *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Econ Bot* 48: 111 – 120.
91. Uysal S., Cvetanovic A., Zengin G., Zekovic Z., Mahomoodally M. F., Bera O. (2019). Optimization of maceration conditions for improving the extraction of phenolic compounds and antioxidant effects of *Momordica charantia* L. leaves through response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANNs). *Anal Lett* 52 (13): 2150 – 2163.
92. Vázquez-Sánchez, A. Y., Aguilar-Zárte, P., Muñiz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Martínez-Ávila, G. C. G. (2019). Effect of ultrasound treatment on the extraction of antioxidants from *Ardisia compressa* Kunth fruits and identification of phytochemicals by HPLC-ESI-MS. *Heliyon* 5 (12).
93. Veillet S., Tomao V., Chemat F. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chem* 123 (3): 905 – 911.
94. Villalva M., Jaime L., Villanueva-Bermejo D., Lara B., Fornari T., Reglero G., Santoyo S. (2019). Supercritical anti-solvent fractionation for improving antioxidant and anti-inflammatory activities of an *Achillea millefolium* L. extract. *Food Res Int* 115: 128 – 134.
95. Villalva M., Silvan J. M., Alarcón-Cavero T., Villanueva-Bermejo D., Jaime L., Santoyo S., Martínez-Rodríguez A. J. (2022). Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial

Properties of an *Achillea millefolium* L. Extract and Its Fractions Obtained by Supercritical Anti-Solvent Fractionation against *Helicobacter pylori*. *Antioxidants* (Basel) 11 (10): 1849.

96. Vitalini S., Beretta G., Iriti M., Orsenigo S., Basilico N., Dall'Acqua S., Iorizzi M., Fico G. (2011). Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochim Pol* 58: 203 – 209.
97. Wojdyło A., Oszmiańska J., Czemerysb R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105: 940 – 949.
98. Yassa N., Saeidnia S., Pirouzi R., Akbaripour M., Shafiee, A. (2007). Three phenolic glycosides and immunological properties of *Achillea millefolium* from Iran, population of Golestan. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 15 (1): 49 – 52.
99. Yousefzadeh N., Zeinivand J. (2013). Essential oil composition of *Achillea millefolium* growing in Darrehshahr township Iran. *Chem Commun* 1:25 – 34.
100. Zainol M. K. , Abd-Hamid A., Yusof S., Muse R. (2003). Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry* 81(4): 575 – 581.

Popis korištenih poveznica:

1. Vélez-Gavilán J. (2016). *Achillea millefolium* (yarrow). CABI compendium. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendum.2636> (pristupljeno 01.08.2024.).
2. Flora Europaea (2024.) <https://eunis.eea.europa.eu/references/1780/species> (pristupljeno 01.08.2024.).
3. Nikolić T. ur. (2024): Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (pristupljeno: 01.08.2024.).

Životopis

Anamarija Novosel rođena je 25. 04. 2000. godine u Zagrebu. Osnovno školsko obrazovanje završava u Zagrebu. Pohađala je srednju školu (Gimnazija Tituš Brezovački) u Zagrebu, koju završava 2019. godine. Iste godine upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, preddiplomski smjer Fitomedicina, koji završava 2022. godine. Diplomski studij, Ekološka poljoprivreda i agroturizam, upisuje 2022. godine.

Od stranih jezika služi se engleskim (B2) i njemačkim (B1).