# Antioksidacijska aktivnost i sadržaj umbeliferona ekstrakata kamilice dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije

**Mendešević, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:217324

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**




*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek









SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Nikolina Mendešević**

# ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I SADRŽAJ UMBELIFERONA EKSTRAKATA KAMILICE DOBIVENIH PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, ožujak 2017.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**
**Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**
**Zavod za procesno inženjerstvo**
**Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale**
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija
**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje
**Tema rada** je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 24. travnja 2016.
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Stela Jokić*
**Komentor:** doc. dr. sc. *Maja Molnar*
**Pomoć pri izradi:** dr.sc. *Krunoslav Aladić*

# Antioksidacijska aktivnost i sadržaj umbeliferona ekstrakata kamilice dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije

*Nikolina Mendešević*, 312-DI

**Sažetak:**
Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja posljednjih godina poprima sve veće razmjere i sve je više obradivih površina u Hrvatskoj namijenjenih upravo za ovu vrstu uzgoja. Kamilica (*Matricaria chamomilla*) je od davnina u narodu poznata kao ljekovita biljka, uglavnom zbog svog protuupalnog, antiseptičkog te spazmolitičkog djelovanja, te sadrži mnoštvo različitih biološki aktivnih tvari. Cilj rada bio je usporediti ekstrakte kamilice dobivene različitim tehnikama ekstrakcije na osnovu njihove antioksidacijske aktivnosti te sadržaja umbeliferona određenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). U tu svrhu analizirani su sljedeći uzorci kamilice dobiveni tijekom različitih faza prerade: nedorađeni cvijet kamilice I. klase, dorađeni cvijet kamilice I. klase, pulvis i otpad od dorade. Uz tradicionalne tehnike ekstrakcije (hidrodestilacija, soxhlet ekstrakcija, maceracija) u radu je korištena i ekstrakcija pomoću superkritičnog $CO_2$ (SC-$CO_2$), te je razvijen i novi sustav maceracije pod visokim tlakom. Najveći prinos ekstrakta (26,52 g/100 g) i najveći udio umbeliferona (44,82 g/100 g) dobiven je maceracijom pod visokim tlakom. Antioksidacijska aktivnost u dobivenim uzorcima kretala se između 45,4 - 73,7% DPPH. Značaj istraživanja očituje se u pružanju mogućnosti korištenja otpada iz procesa prerade kamilice, primjene različitih tehnika ekstrakcije te u mogućnosti dobivanja krajnjeg proizvoda pomoću ekološki prihvatljive SC-$CO_2$ ekstrakcije. Nadalje, novo razvijeni sustav maceracije pod tlakom značajno smanjuje vrijeme ekstrakcije uz dobivanje ekstrakata s većim udjelom komponenata koje doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.

**Ključne riječi:** kamilica, ekstrakcija, umbeliferon, antioksidacijska aktivnost
**Rad sadrži:** 39 stranica
9 slika
2 tablica
0 priloga
55 literaturnih referenci
**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

1. izv. prof. dr. sc. *Lidija Jakobek* — predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. *Stela Jokić* — član-mentor
3. doc. dr. sc. *Maja Molnar* — član-komentor
4. prof. dr. sc. *Mate Bilić* — zamjena člana

**Datum obrane:** 03. ožujka 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**GRADUATE THESIS**

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**
**Faculty of Food Technology Osijek**
**Department of Process Engineering**
**Subdepartment of Process Design and Construction Materials**
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduate program Food Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical sciences
**Scientific field:** Food technology
**Course title:** Technological Design
**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 24, 2016.
**Mentor:** *Stela Jokić*, PhD, associate prof.
**Co-Mentor:** *Maja Molnar*, PhD, assistant prof.
**Technical assistance:** *Krunoslav Aladić*, PhD

**Antioxidant activity and umbelliferone content in chamomile extracts obtained by various extraction techniques**

*Nikolina Mendešević,* 312-DI

**Summary:**
Cultivation of medicinal and aromatic plants is on the increase in recent years and more and more arable land in Croatia is designed specifically for this type of farming. Chamomile (*Matricaria chamomilla*) has been known as a medicinal plant for a long time, mainly due to its anti-inflammatory, antiseptic and antispasmodic action. The aim of this study was to compare chamomile extracts produced with various techniques of extraction based on their antioxidant activity and umbelliferone content applying high performance liquid chromatography (HPLC). The following samples of chamomile were analyzed: unprocessed chamomile flowers first class, processed chamomile flowers first class, pulvis and processing waste. In addition to traditional extraction techniques (hydrodistillation, Soxhlet extraction, maceration), supercritical $CO_2$ extraction (SC-$CO_2$) was performed and a new system of maceration under high pressure has been developed. The greatest extraction yield (26.52 g/100 g) and the highest yield of umbelliferone (44.82 mg/100 g) were obtained using high pressure maceration system. Extracts have also proven to possess antioxidant activity (45.4 – 73.7% DPPH scavenging activity). The significance of this study is reflected in enabling the use of waste from processing chamomile, applying different extraction techniques and attaining products by using environmentally friendly SC-$CO_2$ extraction. Furthermore, a newly developed system of maceration under pressure significantly reduces the time of extraction thereby obtaining extracts that are high in components that contribute to the antioxidant activity.

**Key words:** chamomile, extraction, umbelliferone, antioxidant activity
**Thesis contains:** 39 pages
9 figures
2 tables
0 supplements
55 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

1. *Lidija Jakobek*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Stela Jokić*, PhD, associate prof. — supervisor
3. *Maja Molnar*, PhD, assistant prof. — member
4. *Mate Bilić*, PhD, full prof. — stand-in

**Defense date:** March 03, 2017

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Ovim se putem zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Steli Jokić koja mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada. Veliko joj hvala na strpljenju i razumijevanju te mnogobrojnim savjetima i prenesenom znanju.*

*Zahvaljujem se komentorici doc. dr. sc. Maji Molnar i dr. sc. Krunoslavu Aladiću na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala i mojim prijateljima, ponajviše Martini i Antoniju koji su mi uljepšali studentski život svojim prijateljstvom, palačinkama i bezbrojnim satima smijeha. Posebno hvala Dariju koji je uvijek znao što treba reći.*

*Također se zahvaljujem Jeleni na bezuvjetnoj podršci, bezbrojnim kavama i razgovorima kojima posao čini ljepšim.*

*Naposljetku, veliko hvala roditeljima i bratu koji su mi bili glavna podrška tijekom studiranja i koji su sa mnom prolazili kroz sretne, a ponekad i teške trenutke ovoga dijela moga života.*

# Sadržaj


**1. UVOD ..... 1**

**2. TEORIJSKI DIO ..... 3**

**2.1. KAMILICA ..... 4**

2.1.1. Proces prerade kamilice ..... 4

2.1.2. Kemijski sastav kamilice ..... 5

2.1.3. Primjena kamilice ..... 6

**2.2. TEHNIKE EKSTRAKCIJE ..... 6**

2.2.1. Hidrodestilacija ..... 6

2.2.2. Ekstrakcija organskim otapalima ..... 8

2.2.3. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku ..... 11

2.2.4. Ekstrakcija superkritičnim fluidima ..... 11

**3. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 15**

**3.1. ZADATAK ..... 16**

**3.2. MATERIJAL ..... 16**

3.2.1. Uzorci kamilice ..... 16

3.2.2. Reagensi ..... 17

3.2.3. Uređaji ..... 17

**3.3. METODE ..... 18**

3.3.1. Određivanje udjela vlage ..... 18

3.3.2. Hidrodestilacija ..... 19

3.3.3. Maceracija ..... 19

3.3.4. Soxhlet-ova metoda ekstrakcije ..... 19

3.3.5. SC-$CO_2$ ekstrakcija ..... 20

3.3.6. Maceracija pod visokim tlakom ..... 22

3.3.7. Određivanje sadržaja umbeliferona HPLC metodom ..... 23

3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti dobivenih ekstrakata ..... 23

**4. REZULTATI ..... 25**

**5. RASPRAVA ..... 28**

**6. ZAKLJUČCI ..... 32**

**7. LITERATURA ..... 34**

## Popis oznaka, kratica i simbola

| | |
|---|---|
| $CO_2$ | ugljikov dioksid |
| SC-$CO_2$ | ugljikov dioksid u superkritičnom stanju |
| HPLC | tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti |
| DPPH | 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil |
| GRAS | generalno prihvaćen kao siguran |
| SFE | ekstrakcija superkritičnim fluidima |
| ASE | ubrzana tekućinska ekstrakcija |

# 1. UVOD

Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja posljednjih godina poprima sve veće razmjere i sve je više obradivih površina u Hrvatskoj namijenjenih upravo za ovu vrstu uzgoja. Ljekovito i aromatično bilje se prvenstveno uzgaja jer sadrži biološki aktivne tvari, koje čine osnovne sirovine za proizvodnju lijekova, kozmetičkih pripravaka i aroma za prehrambene proizvode. Kamilica (*Matricaria chamomilla*) je od davnina u narodu poznata kao ljekovita biljka, uglavnom zbog svog protuupalnog, antiseptičkog te spazmolitičkog djelovanja, a i sama sadrži mnoštvo različitih biološki aktivnih tvari. Upravo iz tog razloga kamilica je uzeta kao polazna sirovina za razmatranje u ovom radu. Ljekovitost pripravaka od cvjetova kamilice poznata je u mnogim kulturama preko 2000 godina. Postoji samo nekolicina ljekovitih biljaka koje se mogu pohvaliti svojom tisućljetnom uporabom, stoga ne čudi da kamilica pobuđuje veliki interes znanstvenika različitih područja istraživanja. Patent za prvi ekstrakt kamilice dodijeljen je Chemiewerke Homburg 1921. godine. U današnje vrijeme se istraživačke grupe na sveučilištima i u industriji bave pronalaženjem optimalnih metoda ekstrakcije i stabilnosti pojedinih sastojaka u ekstraktu koji utječu na efikasnost različitih galenskih pripravaka (Schilcher i sur, 2005).

Cilj ovog rada bio je usporediti ekstrakte različitih frakcija kamilice dobivene različitim tehnikama ekstrakcije na osnovu njihove antioksidacijske aktivnosti te sadržaja umbeliferona koji je određen primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). U tu svrhu analizirani su sljedeći uzorci kamilice dobiveni tijekom različitih faza prerade: nedorađeni cvijet kamilice I. klase, dorađeni cvijet kamilice I. klase, pulvis i otpad od dorade. Uz tradicionalne tehnike ekstrakcije, u radu je korištena i zelena tehnika ekstrakcije – ekstrakcija pomoću ugljikovog dioksida u superkritičnom stanju (*eng. Supercritical $CO_2$* ili *SC-$CO_2$)*, a uz to je razvijen i novi sustav maceracije pod visokim tlakom.

Značaj ovog istraživanja očituje se u pružanju mogućnosti korištenja otpada iz procesa prerade kamilice, primjene različitih tehnika ekstrakcije te u mogućnosti dobivanja krajnjeg proizvoda pomoću ekološki prihvatljive SC-$CO_2$ ekstrakcije koji je sasvim prirodan, te bez rezidua organskih otapala (u usporedbi sa ekstraktima dobivenim konvencionalnim tehnikama ekstrakcije) uz potencijalnu primjenu u kozmetičkoj industriji. Nadalje, novo razvijeni sustav maceracije pod tlakom značajno smanjuje vrijeme ekstrakcije uz dobivanje ekstrakata s većim udjelom tvari koje doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.

# 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. KAMILICA

*Matricaria chamomilla,* u narodu poznata pod nazivom kamilica, je jednogodišnja biljka iz porodice Asteraceae. Porijeklo vuče iz južne i istočne Europe, a uzgaja se u Njemačkoj, Francuskoj, Rusiji, Mađarskoj, Hrvatskoj, Sloveniji, Bosni i Hercegovini te Indiji (Ivens, 1979).

Ljekovita svojstva kamilice bila su poznata već i drevnim stanovnicima Egipta, Grčke i Rima, a Anglo-saksi nazvali su je jednom od devet svetih biljaka koju je bog podario ljudima (Crevin i Philpott, 1990).

### 2.1.1. Proces prerade kamilice

Osnova uspješnog uzgoja je proces berbe cvjetova kamilice u vrhuncu cvatnje 3-6 tjedana tijekom ožujka i travnja. Istovremeno se na biljci pojavljuju cvjetovi u svim fazama, ali najbolju kvalitetu krajnjeg proizvoda daju cvjetovi pred punim cvatom. Stoga se selektivna ručna berba ubraja u jednu od skupljih faza uzgoja kamilice te joj se pridodaje velika važnost (Singh i sur., 2011). Iz tog razloga se berba najčešće vrši strojno uz pomoć posebnih kombajna velikog kapaciteta kojima se gubi selektivnost ručne berbe (Schilcher i sur, 2005). Ubrano cvijeće treba odmah prevesti s terena na lokaciju za preradu i privremeno ga skladištiti na zasjenjenom mjestu. Svježi cvijet kamilice, ovisno o navedenim metodama berbe, sadrži različite količine lišća, stabljike, korova te drugih nečistoća koje je potrebno ukloniti jer povećavaju energiju potrebnu za sušenje ili destilaciju, produžuju vrijeme sušenja i podižu temperaturu u hrpama. Nadalje, neadekvatnim skladištenjem u vrećama i boks paletama bez ventilacije dolazi do posmeđivanja cvjetova u vremenu od nekoliko sati. Osim toga, mikrobiološka kontaminacija se drastično povećava te je potrebno što prije ukloniti grube nečistoće kako ne bi došlo do gubitka kvalitete krajnjeg proizvoda (Schilcher i sur, 2005).

Separacija cvjetova od nečistoća se u industriji vrši na velikim, sporo rotirajućim bubnjevima kroz koje prolaze nečistoće, dok cvjetovi kamilice padaju kroz male (5-12 mm) perforirane otvore cilindra bubnja. U drugom koraku masa prolazi kroz male, brzo rotirajuće, gumene valjke koji odstranjuju manje čestice (kao lišće i druge anorganske nečistoće) od cvjetova. Ukoliko neposredna obrada nakon berbe nije moguća, poželjno je skladištiti ubranu biljnu masu u rasutom sloju debljine do 30 cm (Schilcher i sur, 2005).

## 2.1.2. Kemijski sastav kamilice

Kamilica sadrži mnoštvo aktivnih grupa spojeva koje imaju ljekovita svojstva, a najbitnije su terpenoidi, seskviterpeni, flavonoidi, kumarini i poliacetileni (Schilcher i Kamille, 1987). Analizom ekstrakata kamilice utvrđena je prisutnost 11 bioaktivnih fenolnih spojeva: herniarin i umbeliferon (kumarini); klorogenska i kofeinska kiselina (fenilpropanoidi); apigenin, apigenin-7-O-glukozid, luteolin i luteolin-7-O-glikozid (flavoni); kvercetin i rutin (flavonoli); naringenin (flavonon). U cvjetovima kamilice identificirano je preko 120 kemijskih spojeva, koji su sekundarni metaboliti, uključujući 28 terpenoida, 36 flavonoida te 52 dodatna spoja sa potencijalnom farmakološkom primjenom (Grupta i sur., 2010; Singh i sur., 2011).

**Umbeliferon**

Biljni kumarini, kojima pripada i umbeliferon, obično se opisuju kao fitoaleksini i smatraju se obrambenim tvarima koje biljka proizvodi u abiotičkim i biotičkim stresnim uvjetima (Repcak i sur., 2001; Repcak i Suvak, 2012). Sadržaj herniarina i umbeliferona, kao sekundarnih metabolita u listovima kamilice, dokazano je viši ukoliko je biljka podložna abiotičkom stresu (Eliašova i sur., 2004) te su i Petrulova-Poracka i sur. (2013) pokazali da je umbeliferon u listovima kamilice prisutan u većim količinama u odnosu na cvjetne glavice. Uz to, cvjetovi kamilice također sadrže nekoliko kumarina, uključujući herniarin i umbeliferon (Heldmaier i sur., 2009; Petrulova-Poracka i sur., 2013; Pietta, 1987), s tim da je prvobitno spomenut prisutan u većoj koncentraciji u odnosu na umbeliferon (Redaelli i sur., 1981).

Redaelli i sur. (1981) su proučavali različite dijelove cvijeta kamilice zbog sadržaja herniarina i umbeliferona te su pronašli da ligule (jezičasti dijelovi cvijeta) sadrže veću količinu kumarina nego ostali dijelovi cvjetne glavice. Kumarinima slične tvari pokazuju antimikrobnu i protuupalnu aktivnost (Silvan i sur., 1996), dok umbeliferon pokazuje razna biološka svojstva, antioksidacijsku aktivnost in vitro, inhibiciju HIV-1 replikacije i inhibiciju stanične proliferacije različitih humanih tumorskih stanica (Bourinbaiar i sur., 1993; Weber i sur., 1998). Umbeliferon se često koristi u kremama za sunčanje s obzirom da ima veliku sposobnost apsorbiranja ultraljubičastog zračenje pri nekoliko valnih duljina (Sarkar i sur., 2013).

### 2.1.3. Primjena kamilice

Pojam kamilice kao lijek se nalazi u farmakopeji 26 zemalja (Crevin i Philpott, 1990), a koristi se kod nadutosti, kolike, histerije i groznice (Tyihak i sur., 1962). Cvjetovi biljke *Matricaria Chamomilla* sadrže eterično ulje plave boje u količini od 0,2 do 1,9% (Bradley, 1992; Mann i Staba, 2002), koje ima široku primjenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Kamilica se prvenstveno koristi zbog protuupalnog, antiseptičnog i spazmolitičkog djelovanja te kao blago sredstvo za znojenje (Subiza i sur., 1990). Oralno uzimanje kamilice pripravljene kao čaj pomaže kod želučanih smetnji koje prati bol, probavnih smetnji, proljeva i mučnine, upale urinarnog trakta te bolnih menstruacija. Lokalno se primjenjuje u obliku praha koji se nanosi na rane koje sporo zacjeljuju, osipe i infekcije, hemoroide te upale usne šupljine, grla i oka (Fluck, 1988). Nadalje, pripravljaju se i tablete od ekstrakta cvijeta kamilice koje su svoje tržište našle u Europi te se koriste kod raznih bolesti (Subiza i sur., 1990).

Internacionalna potražnja za eteričnim uljem kamilice kontinuirano raste te je, kao rezultat toga, biljka široko uzgajana u Europi i uvedena u nekim azijskim zemljama. Eterično ulje kamilice se, uz antibakterijska i fungicidna svojstva, koristi kao blagi sedativ i za probavne smetnje (Gould i sur., 1973). Osim uporabe u farmaceutskoj industriji, ulje se intenzivno koristi za proizvodnju parfema, kozmetike, u aromaterapiji te prehrambenoj industriji (Masada, 1976). Gowda i sur. (1991) spoznali su da eterično ulje dobiveno iz cvjetnih glavica kamilice zadrži kamazulen te da se koristi za pripravu parfema, kozmetičkih krema, pripravaka za kosu, losiona za kožu, zubne paste te finih likera.

Zbog svojih opsežnih farmakoloških i farmaceutskih karakteristika, kamilica ima veliku gospodarsku vrijednost i potražnju na tržištima Europe (Singh i sur.,2011).

## 2.2. TEHNIKE EKSTRAKCIJE

### 2.2.1. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je tehnika ekstrakcije koja se koristi za ekstrakciju materijala koji se ne miješaju ili se vrlo slabo miješaju sa vodom, a na svojim temperaturama vrenja su nestabilni i podložni oksidaciji (Ames i Matthews, 1968). S obzirom na način tretiranja biljnog materijala, postoje tri načina provođenja hidrodestilacije (Skala i sur., 1999):

1) destilacija vodom,

2) destilacija vodom i vodenom parom te

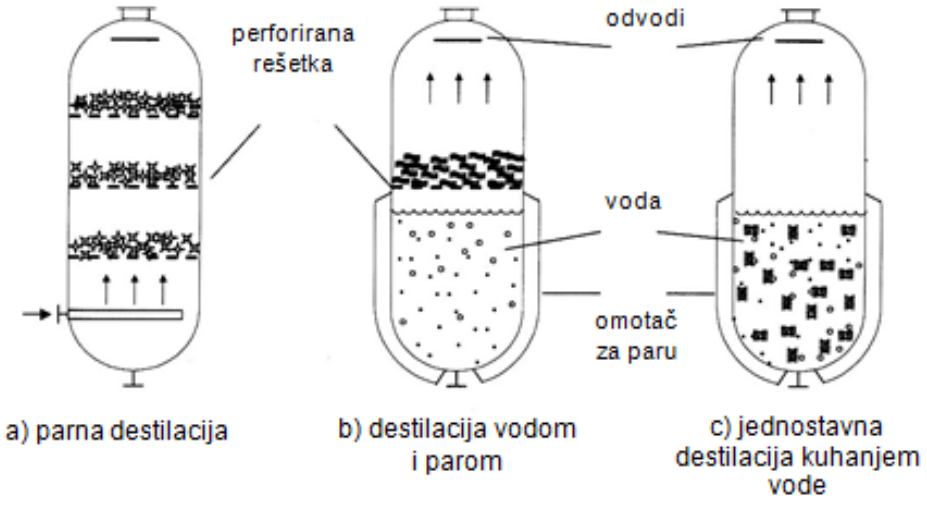
3) destilacija vodenom parom.

Destilacija vodom podrazumijeva proces prilikom kojeg se zagrijava smjesa biljnog materijala i vode, eterično ulje isparava zajedno s vodom i skuplja se u kondenzatoru, a od vode se odvaja dekantiranjem (Ames i Matthews, 1968).

Destilacija vodom i vodenom parom provodi se uz istovremeni kontakt biljnog materijala sa vodom i vodenom parom. Tijekom procesa vodena para se propušta kroz smjesu vode i biljnog materijala, zagrijava ju, zatim eterično ulje isparava zajedno s vodom i kondenzira se u kondenzatoru te odvaja dekantiranjem (Ames i Matthews, 1968).

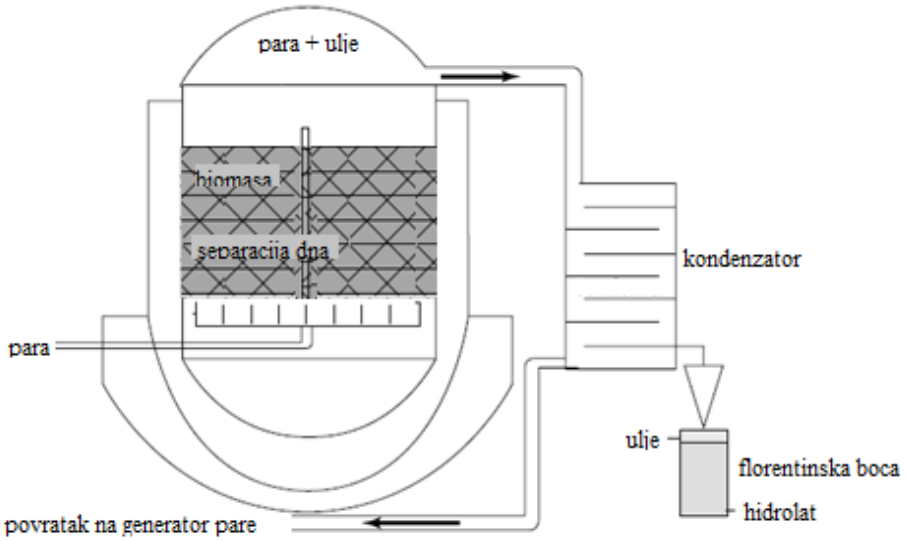
Destilacija vodenom parom se primjenjuje kod destilacije biljnog materijala bogatog eteričnim uljem koje sadrži termostabilne komponente koje se ne miješaju sa vodom. Prilikom procesa vodena para se propušta kroz biljni materijal, zatim eterično ulje zajedno sa parom kondenzira u kondenzatoru, skuplja se te dekantira. Dok se destilacija vodom i destilacija vodom i vodenom parom najčešće primjenjuju u malim ruralnim postrojenjima, destilacija vodenom parom ima veliku primjenu u industriji unatoč većim investicijskim troškovima (Ames i Matthews, 1968).

Hidrodestilatori su ekstraktori u kojima se izoliraju i odvajaju biološki aktivne tvari iz biljnih sirovina najčešće postupkom destilacije vodenom parom, ali i hidrodestilacijom (**Slika 1**) (Meyer-Warnod, 1984).




**Slika 1** Različiti tipovi destilacije (Meyer-Warnod, 1984)

Uređaji za destilaciju vodenom parom sastoje se od triju osnovnih dijelova: kotao za destilaciju, kondenzator i florentinska boca (**Slika 2**). Često veća industrijska postrojenja dodatno imaju odvojenu destilacijsku posudu za sirovinu (koš) i odvojeni parni kotao u kojem se dobiva para, bilo za direktnu destilaciju ili za indirektno grijanje vode preko duplikatora (Schmidt, 2010).




***Slika 2*** *Presjek postrojenja za hidrodestilaciju (Schmidt, 2010)*

## 2.2.2. Ekstrakcija organskim otapalima

Ekstrakcija je jedan od temeljnih separacijskih procesa u pojedinim granama prehrambene industrije, a definira se kao proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. Princip ekstrakcije se zasniva na molekularnoj difuziji koju karakterizira izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir (Lovrić, 2003).

Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (ekstrakcija tekuće-tekuće) ili iz krute faze (ekstrakcija kruto-tekuće), organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima,
- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu,

- otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći,
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti,
- otapalo mora biti što manje zapaljivo, otrovno, te mora biti jeftino (Jerković i Radonić, 2009).

**Maceracija**

Maceracija je postupak namakanja biljnog materijala (usitnjenog ili samljevenog) u zatvorenoj posudi s otapalom, pri sobnoj temperaturi, u trajanju od minimalno 3 dana uz povremeno miješanje. Nakon izvršene ekstrakcije, smjesa ide na prešanje ili filtraciju kako bi se odvojio ekstrakt od netopivog biljnog materijala (tropa). Obzirom na statičnost sistema, izuzevši povremeno miješanje, maceracija se zasniva na principima molekularne difuzije te je stoga spora. Povremenim miješanjem se postiže cirkulacija zasićenog i svježeg otapala koja pogoduje difuziji. Zatvorena posuda sprječava isparavanje otapala tijekom procesa i time sprječava varijacije rezultata ponavljanjem postupka (Schilcher i sur, 2005).

Proces ekstrakcije je pod utjecajem različitih faktora, a najbitniji su:

- brzina difuzije otapala kroz staničnu stijenku,
- brzina otapanja topivih spojeva u otapalu te
- brzina difuzije otopine ili ekstrakta na površinu stanične stijenke.

Ekstrakcija iz krutog materijala se najčešće može ubrzati povećanjem dodirne površine materijala i otapala te smanjenjem radijalne udaljenosti između čestica materijala (miješanjem i mljevenjem). Usitnjavanjem biljnog materijala prije ekstrakcije se povećava dodirna površina, a samim time i učinkovitost ekstrakcije (Schilcher i sur, 2005).

Kako bi se osigurala bolja kvaliteta ekstrakta, u obzir treba uzeti sljedeća saznanja:

I. Iscrpnija ekstrakcija daje bolji prinos ekstrakta.
II. Usitnjavanje materijala i miješanje može pogodovati ekstrakciji.
III. Vrijeme ekstrakcije, temperatura i volumen otapala određuju kvalitetu ekstrakta.

IV. Ekstrakcija nekih ljekovitih biljaka (npr. Hypericum spp.) je vrlo spora tako da se iscrpna ekstrakcija može postići samo cijeđenjem ili višestupanjskom ekstrakcijom. U mnogim slučajevima ekstrakciji pogoduje i povišena temperatura uz duže vrijeme ekstrakcije (ukoliko željeni spojevi nisu termolabilni).

V. Kvaliteta ekstrakta i spektar dobivenih sastojaka također je uvjetovan omjerom biljnog materijala i otapala. Količina ekstrahiranog materijala se proporcionalno povećava sa povećanjem volumena otapala.

VI. Sastav biljnog ekstrakta ovisi o vrsti, koncentraciji i snazi otapanja otapala. Spektar spojeva u ekstraktu može varirati ovisno o hidrofilnoj ili lipofilnoj prirodi otapala.

Osim prvotno opisanog generalnog postupka maceracije, moguće je ponoviti ekstrakciju tropa nekoliko puta ukoliko su biološki aktivne tvari izrazito vrijedne ili se trop ne može prešati. Maceracija velikih količina biljnog materijala se, zbog veće efikasnoti, u industriji provodi kontinuiranom cirkulacijom otapala u ekstraktoru uz pomoć pumpe ili višestupanjskom ekstrakcijom (Schilcher i sur, 2005).

Maceracija je najlakša i najjednostavnija tehnika ekstrakcije. Nedostatak metode je u dugom vremenu trajanja procesa i nastanku velike količine organskog otpada kojeg je potrebno adekvatno zbrinuti.

**Soxhlet-ova metoda ekstrakcije**

Ekstrakcija u aparaturi po Soxhlet-u provodi se tako da se u unutarnji prostor ekstraktora stavi tuljac od filtar-papira, koji se prethodno napuni usitnjenim materijalom i začepi vatom. Otapalo se zagrijava u tikvici s okruglim dnom, isparava u tuljac sa uzorkom, kondenzira u hladilu i kaplje nazad na tuljac. Kada se ekstraktor i cjevčica napune do najviše točke, ekstrakt se prelije u tikvicu i proces se nastavlja. Postupak se ponavlja dok ekstrakt u prostoru oko tuljca ne postane bezbojan, što označava kraj ekstrakcije. Dakle, Soxhlet-ova metoda ekstrakcije je serija kratkih maceracija (Schilcher i sur, 2005).

Ova tehnika ekstrakcije zahtijeva manju količinu otapala u odnosu na maceraciju, ali koristi otapala visoke čistoće što povećava troškove procesa. Ograničenje tehnike leži u samoj prirodi uzorka koji bi u idealnom slučaju trebao biti suh i fino usitnjen. Ekološka neprihvatljivost procesa se očituje u izloženosti opasnim i zapaljivim organskim otapalima

koji mogu ispariti u okolinu tijekom ekstrakcije, što nije slučaj kod naprednih tehnika poput ekstrakcije superkritičnim fluidima (Schilcher i sur, 2005).

### 2.2.3. Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku

Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (*engl. Accelerated Solvent Extraction - ASE*) primjenjuje se za izolaciju širokog spektra biološki aktivnih tvari, a naročito je pogodna za ekstrakciju tvari osjetljivih na oksidaciju. Ova ekstrakcija kombinira povišene temperature i visoke tlakove kako bi postigla brzu, učinkovitu i automatiziranu ekstrakciju biološki aktivnih tvari iz čvrste matrice uzorka. Visoka temperatura (obično 100 °C) povećava difuziju otapala u matricu uzorka zbog smanjenja viskoznosti otapala, pomaže u prekidanju interakcija između analita i matrice, povećava topljivost i prijenos mase. Uporaba tlakova između 6,9 MPa i 17,2 MPa omogućuje ekstrakcije na temperaturama iznad vrelišta otapala i olakšava izdvajanje analita. Uz to, reducira vrijeme ekstrakcije, omogućuje automatizaciju i zahtijeva manje otapala u usporedbi s konvencionalnom tehnikom ekstrakcije po Soxhletu.

Ova metoda se može primijeniti za širok raspon polarnih i nepolarnih tvari, a faktori koji utječu na ovu vrstu ekstrakcije su: vrsta otapala, vrijeme ekstrakcije, temperatura, veličina čestica i udio vode u uzorku. Ekstrakcija se može provoditi uz upotrebu različitih vrsta mono otapala ili smjese različitih vrsta otapala. Prednost ove tehnike ekstrakcije je također i mogućnost provođenja stupnjevite ekstrakcije što je kod nekih analitičkih metoda iznimno važno.

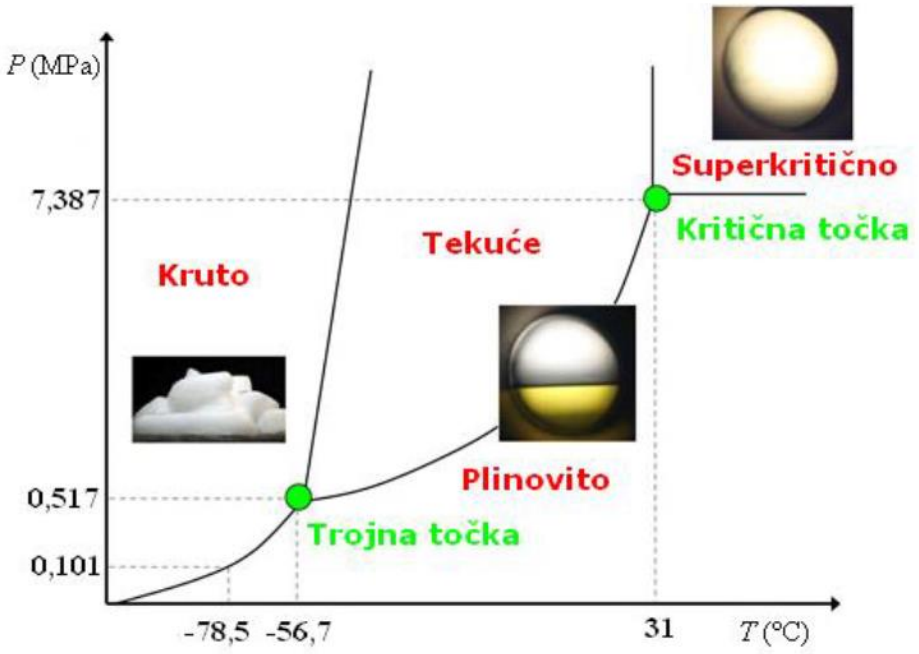
Za razliku od ASE metode, u ovom radu je provedena maceracija pod visokim tlakom pri sobnoj temperaturi (bez dovoda topline) čiji je postupak te konstrukcija samog uređaja opisana kasnije u tekstu.

### 2.2.4. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (*engl. Supercritical fluid extraction – SFE*) ili superkritična ekstrakcija je operacija prijenosa tvari bazirana na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (Jokić, 2011).

Ova tehnika ekstrakcije kao otapalo koristi plin, najčešće je to ugljikov dioksid ($CO_2$), koji se prevodi u superkritično stanje zagrijavanjem iznad kritične točke ili tlačenjem iznad kritičnog

tlaka (**Slika 3**) (Jokić, 2011). Pri opisanom stanju fluid nije niti plin niti tekućina, ali ima sposobnost otapanja poput tekućina i snagu prijenosa uobičajenu za plinove (Askin i Ötles, 2005). Nadalje, gustoća fluida približava se gustoći tekućine, viskoznost se približava viskoznosti normalnih plinova, topljivost topljivih tvari je vrlo velika, a difuzija je dva reda veličine veća nego kod tipičnih tekućina (Brunner, 2005; Lovrić, 2003).




***Slika 3*** *Fazni dijagram (tlak – temperatura) za $CO_2$ (Jokić, 2011)*

SFE se odvija u pet uzastopnih faza (Jokić, 2011):

- difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje,
- prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala,
- kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari,
- difuzija otopljene tvari u superkritičnom fluidu kroz sloj vanjskog sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice,
- difuzija otopljene tvari u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida.

Najznačajniji čimbenici (Jokić, 2011) koji utječu na sam tijek SFE su:

- tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije i protok otapala,
- gustoća, viskozitet te difuzivnost otapala i tvari koja se ekstrahira,
- interakcije između molekula otapala, topljive tvari i netopljivog dijela krutog materijala u kome se nalazi topljiva tvar, koje utječu na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije,
- dodatak različitih kootapala,
- oblik, veličina i raspodjela veličina čestica materijala u sloju, poroznost čestica te poroznost sloja.

Najpoželjnije otapalo koje se koristi u preko 90% slučajeva SFE je SC-$CO_2$ zbog toga što je neotrovan, nezapaljiv, bez okus i mirisa, jeftin i lako dostupan, ekološki prihvatljiv i GRAS otapalo. $CO_2$ se primjenjuje za ekstrakciju prirodnih tvari i u tehnologiji pojedinih prehrambenih proizvoda s obzirom da ima dobra svojstva otapanja većine sastojaka koji se koriste u proizvodnji hrane, uz razmjerno nisku kritičnu temperaturu od 31,3 °C pri kritičnom tlaku 72,9 bara. Osim njega, korišteni su i etan, propan, butan i neki halogenirani ugljikovodici (Bijuk, 2015; Jokić, 2011; Lovrić, 2003). SC-$CO_2$ otapa nepolarne ili blago polarne spojeve i stoga je kompatibilan za otapanje lipofilnih nepolarnih spojeva kao što su lipidi i eterična ulja. Dodatkom polarnih kootapala (npr. etanola) se može povećati topivost polarnih spojeva i selektivnost procesa (Bijuk, 2015; Capuzzo i sur., 2013; Abbas i sur., 2008).

Prednosti SFE u odnosu na tehniku ekstrakcije s organskim otapalima navodi Jokić (2011):

- Superkritični fluidi imaju sposobnost otapanja istovjetnu organskim otapalima, ali uz bolju difuziju, nižu viskoznost i manju površinsku napetost fluida.
- Separacija ekstrakta od otapala je brza i laka jer je promjenom tlaka i temperature moguće regulirati topljivost tvari.
- Topljivost polarnih tvari je moguće poboljšati dodavanjem kootapala (metanola, etanola, vode i dr.) čime se postiže veća selektivnost tijekom separacije.
- Otapala korištena za SFE su jeftina i sigurna za okoliš, a u industrijskim procesima ih je moguće reciklirati.
- Termolabilne tvari se ekstrahiraju s minimalnim deformacijama.

- SFE se može primijeniti na sustave različitog kapaciteta – od analitičkih, preparativnih, poluindustrijskih do velikih industrijskih postrojenja.

Usprkos relativno visokim investicijskim troškovima za procesnu opremu, u mnogim je slučajevima trošak proizvodnje istovjetan klasičnim tehnikama ekstrakcije. Također, pogonski troškovi su znatno niži zahvaljujući lakoj regeneraciji otapala (Ahmed i Rahman, 2012; Jokić, 2011).

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovoga rada proveden je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale te na Katedri za kemiju i ekologiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku.

## 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- Odrediti udio ulja i vlage u uzorcima kamilice u aparaturi po Soxhlet-u i standardnom metodom AOAC 925.40,
- Pripremiti materijal za ekstrakciju usitnjavanjem s ciljem povećanja površine uzorka,
- Provesti ekstrakciju uzoraka kamilice pomoću hidrodestilacije, soxhlet ekstrakcije, maceracije primjenom 50%-tne vodene otopine etanola, SC-$CO_2$ na laboratorijskom uređaju za ekstrakciju superkritičnim fluidima te maceracije pod visokim tlakom na novo konstruiranom uređaju za ekstrakciju,
- Odrediti antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kamilice koristeći DPPH metodu,
- Odrediti udio umbeliferona primjenom HPLC metode.

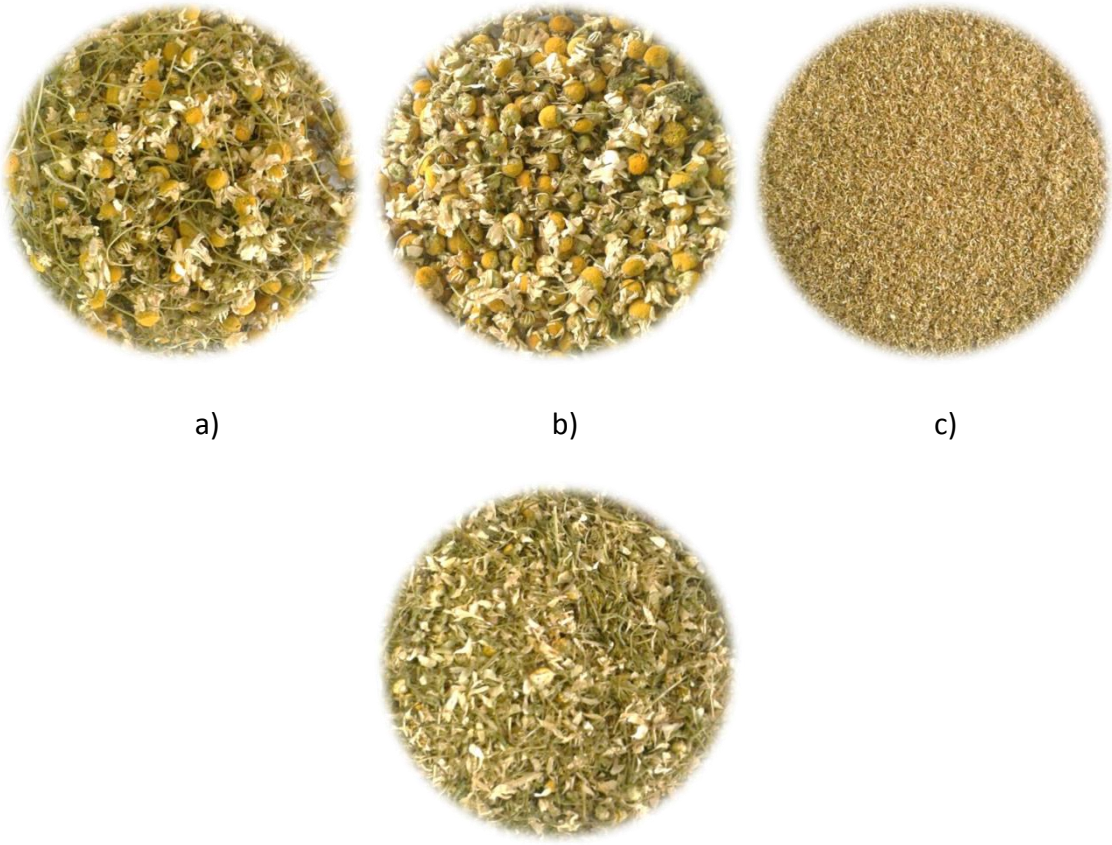
## 3.2. MATERIJAL

### 3.2.1. Uzorci kamilice

U radu su korišteni uzorci kamilice dobiveni tijekom različitih faza prerade: nedorađeni cvijet kamilice I. klase, dorađeni cvijet kamilice I. klase, pulvis i otpad od dorade. Svi uzorci su prikupljeni u svibnju 2015. godine, a nabavljeni su iz tvrtke Matricia d.o.o. iz Širokog Polja.

Nedorađeni cvijet kamilice I. klase (**Slika 4a**) podrazumijeva materijal dobiven nakon rezanja svježe kamilice uređajem za rezanje biljaka. Rezanjem stabljike na ubranim cvjetovima se dobije dorađeni cvijet I. klase (**Slika 4b**). Pulvis (**Slika 4c**) podrazumijeva dijelove cvijeta koji se oslobađaju manipulacijom osušenih cvjetnih glavica, a otpadom od dorade (**Slika 4d**) se smatra ostatak nakon procesiranja ubrane kamilice.

Svi uzorci su prije ekstrakcije usitnjeni koristeći laboratorijski mlin.



a) b) c)

d)

**Slika 4** Analizirani uzorci kamilice

*a) Nedorađeni cvijet I. klase, b) Dorađeni cvijet I. klase, c) Pulvis, d) Otpad od dorade*

## 3.2.2. Reagensi

Korišteni su sljedeći reagensi:

- *n*-heksan, etanol i dr. otapala analitičke čistoće (J.T. Baker, PA, SAD),
- $CO_2$ čistoće 99,97% proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska),
- standard umbeliferona čistoće 99,9% proizvođača Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Njemačka),
- Etil-acetat (Sigma-Aldrich, Steiheim, Njemačka),
- DPPH (Sigma-Aldrich, Steiheim, Njemačka).

## 3.2.3. Uređaji

Korišteni su sljedeći uređaji:

- Analitička vaga (Denver instruments, Njemačka),
- Tehnička vaga (Kern, Njemačka),
- Mlin (Janke & Kunkel, IKA labortechnik, Njemačka),
- SOXTHERM (Gerdhart, Njemačka),
- Uređaj za SC-$CO_2$ ekstrakciju (PTF Osijek, Hrvatska),
- Kolona OSMOSIL 5C18-MA-II (NacalaiTesque, Inc., Kyoto, Japan)
- UV visible spektrofotometar Helios γ, (Thermo Spectronic, Cambridge, UK).

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Određivanje udjela vlage

Udio vlage u uzorcima kamilice određen je prema standardnoj metodi AOAC 925.40 (2000.) u dva ponavljanja. U osušenu, izvaganu aluminijsku posudicu izvagano je 5 g uzorka te je skupa s otvorenim poklopcem stavljena u zagrijan sušionik (103 °C). Nakon 2 h sušenja posudica s poklopcem je stavljena u eksikator na hlađenje do sobne temperature. Nakon hlađenja, uzorak je izvagan te s podignutim poklopcem ponovo stavljen u sušionik na 1 h. Ponovljeno je vaganje uzorka nakon isteka vremena. Sušenje i vaganje se ponavljalo do konstantne mase, odnosno dok razlika između dva uzastopna mjerenja nije bila najviše 0,005 g. Udio vlage u uzorcima izračunat je pomoću sljedećeg izraza (1):

$$Udio\ vlage = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \qquad (1)$$

gdje je:

$m_0$ – masa prazne posudice (g),

$m_1$ – masa posudice sa uzorkom prije sušenja (g),

$m_2$ – masa posudice sa uzorkom nakon sušenja (g).

Analiza je provedena u dva ponavljanja.

### 3.3.2. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je provedena u aparaturi po Clevenger-u sa 100 g uzorka (cvjetne glavice kamilice) u trajanju od 4 h. Dobiveno eterično ulje je osušeno pomoću bezvodnog $MgSO_4$ i skladišteno pri 4-6 °C do daljnih analiza.

### 3.3.3. Maceracija

Odvagano je 20 g usitnjenog uzorka te dodano 100 ml 50%-tne vodene otopine etanola. Uzorci su namakani 5 dana pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu uz povremeno miješanje (Council of Europe, 2014). Nakon završene maceracije, alkoholni ekstrakt je profiltriran kroz filter papir kako bi se uklonile eventualne grube nečistoće te koncentriran na rotacionom vakuumskom uparivaču pri 35 °C. Dobiveni ekstrakti skladišteni su u tamnom pri 4-6 °C do daljnih analiza.

### 3.3.4. Soxhlet-ova metoda ekstrakcije

Soxhlet-ova metoda ekstrakcije provedena je u automatskom sustavu za ekstrakciju SOXTHERM s *n*-heksanom kao otapalom (**Slika 5)**. Tikvice za ekstrakciju su osušene (103 ± 2 °C) i izvagane s točnošću odvage 0,001 g te stavljeni su prethodno odvagani uzorci (5 ± 0,001 g) stavljeni u tuljce. U tikvice se preko tuljca ulilo 150 ml *n*-heksana. Ukupno vrijeme ekstrakcije iznosilo je 8 h. Otapalo je otpareno pod vakuumom, a tikvice sa ekstraktima su izvagane te skladištene pri 4-6 °C. Analiza je provedena u dva ponavljanja.




**Slika 5** Soxterm ekstrakcijski uređaj

Količina ekstrakta u uzorcima dobivena je pomoću sljedećeg izraza (2):

$$Količina\ ekstraksta = \frac{m_3 - m_4}{m_5} \times 100 \qquad (2)$$

gdje je:

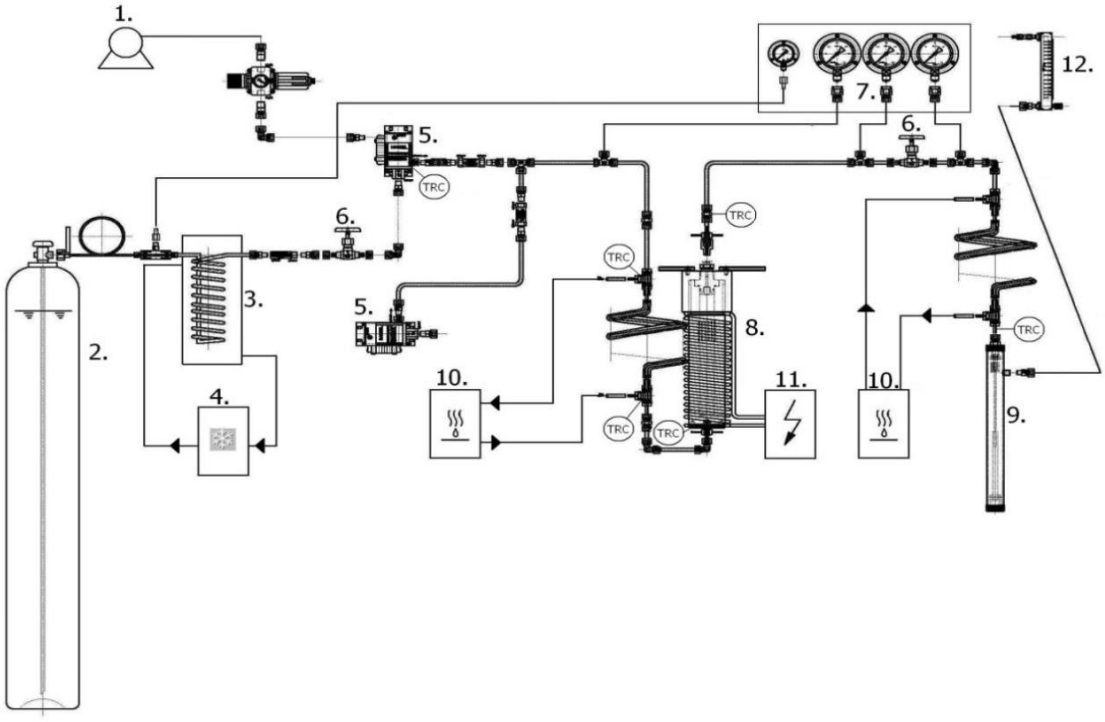
$m_3$ – masa tikvice sa ekstraktom (g),

$m_4$ – masa prazne tikvice (g),

$m_5$ – masa ispitivanog uzorka (g).

### 3.3.5. SC-$CO_2$ ekstrakcija

Ekstrakcija je provedena u sustavu za SFE (**Slika 6** i **7**) čije je projektiranje, konstrukcija te izrada uređaja opisana u detalje u drugoj literaturi (Jokić i sur., 2015; Aladić, 2015).




***Slika 6*** *Procesna shema uređaja za SC-$CO_2$ ekstrakciju (Aladić, 2015)*

1. Kompresor, 2. $CO_2$ spremnik, 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika, 4. Rashladna kupelj, 5. Zrakom pogonjena pumpa Haskel MS-71, 6. Ventili (B-HV), 7. Manometri, 8. Ekstraktor, 9. Separator, 10. Vodena kupelj, 11. Centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana, 12. Mjerač protoka



**Slika 7** *Uređaj za superkritičnu ekstrakciju (Aladić, 2015)*

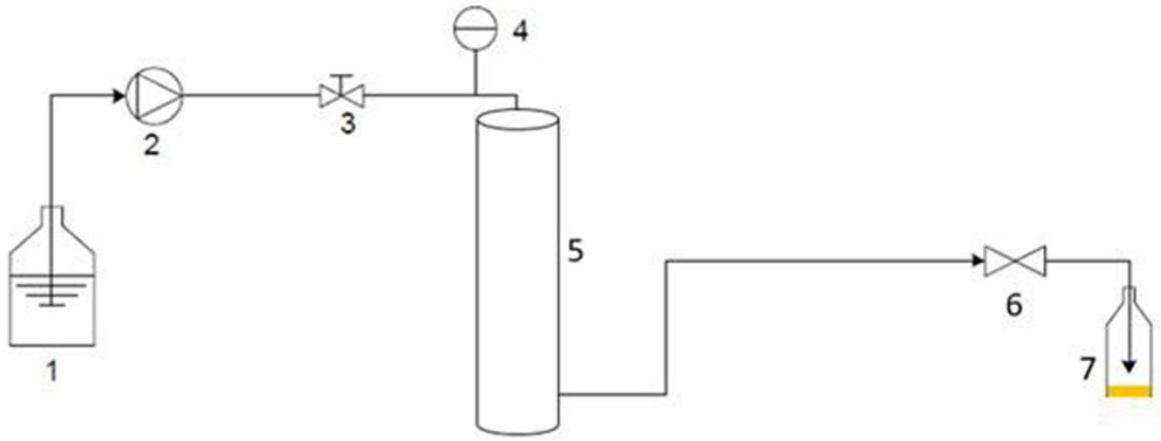
Odvagano je 100 g usitnjenog uzorka koji je smješten u ekstrakcijsku kolonu. Ekstrakt je skupljen u separatoru u prethodno izvagane staklene epruvete pri 1,5 MPa i 25 °C. Količina dobivenog ekstrakta u određenim vremenskim intervalima je utvrđena korištenjem vage preciznosti ± 0,0001 g, a prinos ekstrakcije iskazan je u % (g ekstrakta/100 g uzorka). Ekstrakcija je za svaki uzorak provedena pri tlaku od 30 MPa i temperaturi 40 °C te je korišten dinamički način ekstrakcije pri kojem SC-$CO_2$ kontinuirano prolazi kroz uzorak (kamilicu). Masa ispitivanog uzorka u ekstraktoru, vrijeme ekstrakcije i brzina protoka $CO_2$ su bili konstantni tijekom provedbe ekstarkcije. Protok $CO_2$ (2 kg/h) je kontroliran preko Matheson FM-1050 (E800) mjerača protoka. Maksimalno moguće izmjereni protok je 63,03 SLPM (*engl. Standard Liter Per Minute*). Vrijeme ekstrakcije za svaki uzorak je iznosilo 90 min, utvrđeno prema provedenim preliminarnim istraživanjima (prolongiranjem vremena ekstrakcije neznatno se povećao prinos). Dobiveni ekstrakti skladišteni su u hladnjaku pri 4-6 °C do analiza.

## 3.3.6. Maceracija pod visokim tlakom

Novokonstruirani uređaj za maceraciju pod visokim tlakom je prikazan na **Slici 8,** a dijelovi i izrada samog uređaja opisani su u daljnjem tekstu.

Materijal koji je korišten za izradu sustava je od nehrđajućeg čelika AISI 304. Svi dodatni spojni cijevni dijelovi su također od istog materijala. Ekstraktor je testiran pri faktoru sigurnosti 1,5. Ekstrakcijska kolona je izrađena od bešavnih cijevi od nehrđajućeg čelika dimenzije 60 x 5,4 mm (vanjski promjer x debljina stjenke) i ispitana je na radni tlak od 50 MPa. Gornji i donji unutarnji dio kolone su polirani kako bi čepovi dobro brtvili. Zatvarači ekstrakcijske kolone su izrađeni od navojnih čepova. Donji i gornji dio ekstraktora je izbušen i pripremljen za brzi spoj s R ½" navojem uz brtvljenje s O-prstenom. Tlak unutar ekstraktora kontrolira manometar (60 MPa WIKA model 212.20). Spajanje sustava u cjelinu izvela je tvrtka Đuro Đaković Aparati d.o.o. (Slavonski Brod, Hrvatska), koji je obavila sve potrebne testove izdržljivosti materijala i tlačne probe posuda pod tlakom.

Za provedbu eksperimenta odvagano je 100 g usitnjenog uzorka koji je smješten u ekstrakcijsku kolonu zajedno sa 500 ml 50%-tne otopine etanola (omjer 1:5 kao kod klasične maceracije). Maceracija je provedena pri tlaku od 40 MPa pri sobnoj temperaturi u trajanju od 4 h. Alkoholni ekstrakt je profiltriran kroz filter papir kako bi se uklonile eventualne grube nečistoće te koncentriran na rotacionom vakuumskom uparivaču pri 35 °C. Dobiveni ekstrakt skladišten je u tamnom pri 4-6 °C do analiza.




***Slika 8*** *Sustav maceracije pod visokim tlakom*

1. Spremnik otapala; 2. Zračna pumpa Haskel MS-188; 3. Ventil (B-HV); 4. Manometar; 5. Ekstrakcijska kolona; 6. Ventil (B-HV); 7. Posuda za hvatanje ekstrakta

### 3.3.7. Određivanje sadržaja umbeliferona HPLC metodom

Sadržaj umbeliferona u dobivenim ekstraktima određen je RP-HPLC metodom sa UV detekcijom prema uputama za korištenu kolonu. HPLC analiza provedena je na Varian ProStar sustavu (Varian Analytical Instruments, CA, USA) koji se sastoji od Varian ProStar 230 modula za dotok otapala i ProStar 330 detektora sa nizom dioda. Sustav je bio spojen na ProStar 5.5 Star Chromatography Workstation i PolyView 2000 V 6.0. Kromatografsko odjeljivanje sastojaka provedeno je na koloni COSMOSIL 5C18-MA-II (NacalaiTesque, Inc., Kyoto, Japan), dužine 150 mm i unutarnjeg promjera 4,6 mm.

Odjeljivanje je postignuto gradijentskim eluiranjem (uz protok od 1 ml/min) sa destiliranom vodom kao fazom A i metanolom kao fazom B. Proveden je sljedeći gradijent: 0-15 min, 60% faze A i 40% faze B; 15-20 min, povećanje faze B na 80% i smanjenje faze A na 20%; 20-40 min, održavanje 20% faze A i 80% faze B; 40-41 min, smanjenje faze B na 40% i povećanje faze A na 60%; 41-50 min, održavanje 60% faze A i 40% faze B. U uređaj je injektirano 20 µL uzorka. Odjeljivanje je provedeno pri sobnoj temperaturi, a detekcija je izvršena pri valnoj duljini od 330 nm.

Pripremljene su otopine standarda umbeliferona, te je kalibracija napravljena sa 6 koncentracija (1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 mg/l). Linearnost kalibracijske krivulje je potvrđena koeficijentom korelacije koji za umbeliferon iznosi 0,9996. Limit detekcije (LOD) za umbeliferon iznosi 0,16 mg/l, a limit kvantifikacije 0,52 mg/l dok je vrijeme zadržavanja 13,37 min. Ekstrakti su razrijeđeni u metanolu HPLC čistoće, filtrirani kroz 0,45 µm PTFE filter i podvrgnuti HPLC analizi. Dobivena koncentracija umbeliferona u biljnim ekstraktima (µg/ml) je korištena za izračun prinosa umbeliferona izraženog kao mg umbeliferona/100 g uzorka kamilice.

### 3.3.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti dobivenih ekstrakata

Antioksidacijska aktivnost dobivenih ekstrakata kamilice je određena DPPH metodom koja je detaljno opisana u drugoj literaturi (Jokić i sur., 2016). Ekstrakti su otopljeni u metanolu (125 µg/ml) te im je dodana 0,3 mM otopina DPPH radikala. Sva mjerena provedena su u tri ponavljanja. Nakon inkubacije (30 min na sobnoj temperaturi) izmjerena je apsorbancija pri 517 nm i određena vezajuća aktivnost DPPH prema izrazu (3):

$$\%\ DPPH\ aktivnost = \frac{(A_{\mathrm{DPPH}} + A_{\mathrm{b}}) - A_s}{A_{\mathrm{DPPH}}} \times 100 \qquad (3)$$

gdje je $A_{DPPH}$ apsorbancija kontrole, $A_b$ apsorbancija uzorka, a $A_s$ apsorbancija uzorka pomiješanog s otopinom DPPH.

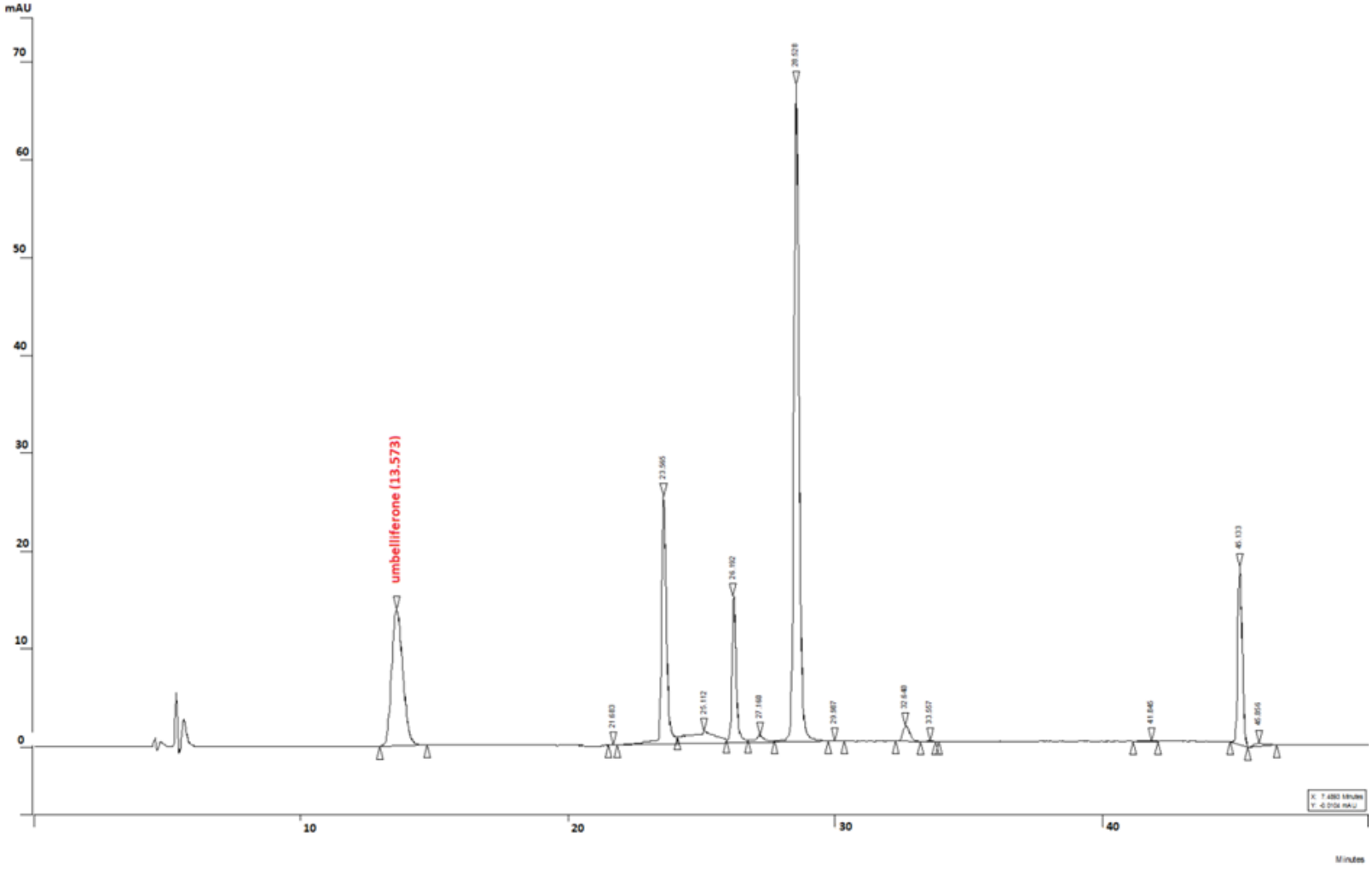
# 4. REZULTATI

**Tablica 1** Udio vlage u analiziranim uzorcima kamilice

| Matriks | Udio vlage [%] |
|---|---|
| Nedorađeni cvijet I. klase | 12,2 |
| Dorađeni cvijet I. klase | 12,7 |
| Pulvis | 10,45 |
| Otpad od dorade | 12,54 |

**Tablica 2** Prinos ekstrakcije (g ekstrakta/100 g uzorka), udio umbeliferona (mg umb/100 g uzorka) i DPPH (%) vrijednost analiziranih uzoraka ekstrakata kamilice

| Metoda ekstrakcije/uzorak | Prinos ekstrakcije [g/100 g] | Udio umbeliferona [mg umb/100 g] | DPPH [%] |
|---|---|---|---|
| SFE | | | |
| Nedorađeni cvijet I. klase | 1,57 | 0,00 | 5,10 |
| Dorađeni cvijet I. klase | 3,64 | 0,33 | 3,40 |
| Otpad od dorade | 0,23 | 0,02 | 4,50 |
| Pulvis | 0,97 | 0,32 | 7,20 |
| SOXHLET | | | |
| Nedorađeni cvijet I. klase | 4,60 | 0,50 | 2,00 |
| Dorađeni cvijet I. klase | 4,98 | 0,00 | 1,30 |
| Otpad od dorade | 3,47 | 0,85 | 2,50 |
| Pulvis | 1,45 | 0,13 | 0,00 |
| MACERACIJA | | | |
| Nedorađeni cvijet I. klase | 20,85 | 5,59 | 56,00 |
| Dorađeni cvijet I. klase | 22,30 | 4,78 | 55,00 |
| Otpad od dorade | 20,60 | 11,85 | 61,50 |
| Pulvis | 6,70 | 5,26 | 45,40 |
| MACERACIJA POD VISOKIM TLAKOM | | | |
| Nedorađeni cvijet I. klase | 26,52 | 44,82 | 73,70 |
| HIDRODESTILACIJA | 0,62 | 0,01 | 3,80 |




**Slika 9** HPLC kromatogram ekstrakta kamilice

# 5. RASPRAVA

Ekstrakti različitih frakcija kamilice u ovom istraživanju dobiveni su primjenom pet različitih ekstrakcijskih tehnika. Prinos ekstrakata, udio umbeliferona i antioksidacijska aktivnost izražena kao % DPPH dobivenih ekstrakata prikazani su u **Tablici 2**.

Primjer kromatograma dobivenog HPLC analizom ekstrakta dobivenog iz otpada od dorade kamilice prikazan je na **Slici 9.** Visoki udio umbeliferona u ovom ekstraktu se može objasniti činjenicom da otpad od dorade kamilice većinom čine listovi i stabljike koji često sadrže veći udio umbeliferona od cvjetova kamilice.

Najveći prinos ekstrakcije postignut je koristeći novo razvijeni sustav maceracije pod visokim tlakom kojim se smanjuje vrijeme ekstrakcije te dobivaju ekstrakti sa većom antioksidacijskom aktivnošću. Upotrebom sustava maceracije pod visokim tlakom dobivaju se ekstrakti sa 7 puta većim udjelom umbeliferona u odnosu na konvencionalnu maceraciju. To se može objasniti pozitivnom korelacijom između tlaka i topljivosti biološki aktivnih tvari, odnosno topljivost tvari je bolja uz povećanje tlaka. Jun (2013) je u svojim istraživanjima dokazao da visokotlačne tehnike skraćuju vrijeme procesa te poboljšavaju prodiranje otapala u biljne stanice što dovodi do visoke propusnosti i viših prinosa. Nadalje, spomenuta ekstrakcija se provodi na sobnoj temperaturi bez zagrijavanja te nema negativnog utjecaja na aktivnost i strukturu biološki aktivnih tvari iz biljnog materijala. U procesu maceracije, etanol je odabran kao otapalo zbog njegove ekološke prihvatljivosti, niske cijene te sposobnosti izolacije željenih tvari iz biljnog materijala.

Prinosi ekstrakcije koristeći SC-$CO_2$ ekstrakciju se mogu usporediti sa prinosima dobivenim s *n*-heksanom u aparaturi po Soxhletu, dok su procesom maceracije s 50%-tnom vodenom otopinom etanola prinosi mnogo veći (**Tablica 2**). To se može objasniti sličnim kapacitetom otapanja tvari pomoću SC-$CO_2$ i *n*-heksana jer su oba nepolarna otapala koja otapaju uglavnom samo nepolarne tvari dok etanol kao polarno otapalo otapa topljive polarne tvari. S obzirom na navedeno, SC-$CO_2$ ekstrakcija je selektivnija tehnika ekstrakcije u odnosu na maceraciju. Sličan zaključak su donijeli i Felfoldi-Gava i sur. (2012) koji su objavili kako je približno 20 puta veći prinos ekstrakata dobivenih etanolom u odnosu na ekstrakte dobivene sa SC-$CO_2$ ili *n*-heksanom. Roby i sur. (2013) su također usporedili različita otapala prilikom ekstrakcije cvijeta kamilice i pronašli kako je prinos ekstrakcije najveći korištenjem metanola kao otapala, zatim slijede etanol, dietil-eter i heksan.

Udio eteričnog ulja dobiven postupkom hidrodestilacije iz cvjetova kamilice u ovom istraživanju iznosi 0,6%. Udio eteričnog ulja kamilice je vrlo nizak i obično se nalazi u rasponu 0,3 – 1,5% (Schilcher i sur., 2005), dok su Roby i sur. (2013) u svom istraživanju postigli udio od 0,73%. Eterično ulje kamilice dobiveno na ovaj način je karakteristične plave boje, dok su SFE ekstrakti i ekstrakti dobiveni 50%-tnom vodenom otopinom etanola tamno žute boje što je u skladu sa rezultatima istraživanja Reverchon i Senatore (1994). Tamno žuta boja pokazuje da nije došlo termičke degradacije prirodno prisutnog matricina u kamazulen. Tijekom parne destilacije ili izlaganjem toplini se matricin prevodi u kamazulen, seskviterpen koji je odgovaran za plavu boju eteričnog ulja (Singh i sur., 2011; Ness i sur., 1996).

Kotnik i sur. (2007) su ispitali SC-$CO_2$ ekstrakciju cvjetova kamilice i rezultati su uspoređeni s onima postignutima sa Soxhlet ekstrakcijom, parnom destilacijom i maceracijom. Prinosi ekstrakcije postignuti konvencionalnom maceracijom sa etanolom i Soxhlet ekstrakcijom su viši i do 10% nego prinosi dobiveni sa SFE (3,81%), dok su prinosi postignuti destilacijom vrlo niski i slični onima u ovom istraživanju, 0,60%. Uz to, kamazulen je otkriven samo u ekstraktu koji je dobiven parnom destilacijom, a u ostalim uzorcima nije bio prisutan. Scalia i sur. (1999) su također usporedili SFE sa konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama za izolaciju biološki aktivnih tvari prisutnim u cvjetovima kamilice. Prinos eteričnog ulja dobiven prilikom SFE bio je 4,4 puta viši u odnosu na onaj dobiven parnom destilacijom, slično kao i u ovom istraživanju.

Koristeći SC-$CO_2$ ekstrakciju, degradacija termolabilnih tvari (primjerice matricina) je svedena na minimum i prinos hlapljivih tvari je povećan. Stoga, mogućnost proizvodnje biljnih ekstrakata bez ikakvog kontakta s konvencionalnim organskim otapalima (što omogućuje direktnu upotrebu), čini SC-$CO_2$ ekstrakciju atraktivnom alternativom trenutno korištenim konvencionalnim tehnikama ekstrakcije.

Kako je *M. Chamomilla* dobro poznata po prisutnosti umbeliferona (Petrulova-Poracka i sur., 2013), mnogi znanstvenici su se bavili njegovom izolacijom iz biljke. Umbeliferon se može ekstrahirati sa vodom (Chanfrau i Ferrada, 2014), etanolom ili vodenom otopinom etanola (Stanojevic i sur., 2007), metanolom (Skalicka-Wozniak i Glowniak, 2012), dok otapala poput etera ili diklormetana nisu tako učinkovita (Skalicka-Wozniak i Glowniak, 2012). Bajerova i sur. (2014) su usporedili različite tehnike ekstrakcije umbeliferona iz različitih biljaka dokazujući da je Soxhlet ekstrakcija sa metanolom bila najučinkovitija, dok SFE nije bila

učinkovita vjerojatno iz razloga što je $CO_2$ nepolarno otapalo. To je u skladu sa zaključcima dobivenim u **Tablici 2**, gdje je pokazano kako su polarna otapala (npr. etanol) učinkovitija od nepolarnih (poput *n*-heksana i $CO_2$).

Podaci o udjelu umbeliferona pokazuju kako je najviši udio (44,82 mg/100 g) pronađen u ekstraktu cvjetova kamilice dobivenim pomoću maceracije pod visokim tlakom. Nadalje, zanimljivo je kako je visok udio umbeliferona određen u uzorcima otpada od dorade cvjetova kamilice (11,85 mg/100 g) dobivenim konvencionalnom maceracijom. To se može objasniti činjenicom da su dijelovi koji zaostaju nakon obrade kamilice uglavnom listovi koji su također bogati umbeliferonom, često čak i više nego cvjetovi (Petrulova-Poracka i sur., 2013).

Ekstrakti kamilice također posjeduju antioksidacijsku aktivnost (45,4 – 73,7% aktivnost neutralizacije DPPH). Ekstrakti u etanolu dobiveni tehnikom maceracije pod visokim tlakom pokazuju najbolju aktivnost neutralizacije DPPH među svim primijenjenim ekstrakcijskim tehnikama, dok ekstrakti dobiveni konvencionalnom maceracijom sa etanolom također posjeduju dobru antioksidacijsku aktivnost. To je očekivano s obzirom da su polarna otapala učinkovitija u ekstrakciji polarnih tvari, kao što su polifenoli, koji značajno doprinose antioksidacijskoj aktivnosti. Bajerova i sur. (2014) su također pronašli kako ekstrakti kamilice dobiveni upotrebom polarnih otapala posjeduju bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte dobivene SC-$CO_2$ ekstrakcijom. Nadalje, Formisano i sur. (2015) su usporedili antioksidacijsku aktivnost ekstrakata kamilice u metanolu i eteričnog ulja te su pronašli kako ekstrakti u metanolu pokazuju mnogo bolju aktivnost u odnosu na eterična ulja, uz pretpostavku da su ekstrakti u metanolu bogatiji fenolima, koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.

# 6. ZAKLJUČCI

*Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:*

1. Udio vlage u analiziranim uzorcima kamilice se kretao od 10,56% za pulvis do 12,7% za dorađeni cvijet kamilice I. klase.

2. Najveći prinos ekstrakcije je dobiven primjenom novo razvijene tehnike maceracije pod visokim tlakom – 26,52 g ekstrakta/100 g nedorađenog cvijeta kamilice I. klase.

3. Najveći udio umbeliferona je dobiven tehnikom maceracije pod visokim tlakom – 44,82 mg umbeliferona/100 g biljke, nakon toga slijede ekstrakti dobiveni konvencionalnom maceracijom sa 50%-tnim etanolom od kojih se ističe otpada od dorade cvjetova kamilice sa 11,85 mg umbeliferona/100 g biljke.

4. Ekstrakti u etanolu dobiveni tehnikom maceracije pod visokim tlakom pokazuju najbolju aktivnost neutralizacije DPPH među svim primijenjenim ekstrakcijskim tehnikama – 73,7%, dok su na drugom mjestu ekstrakti dobiveni konvencionalnom maceracijom sa etanolom kod kojih se ističe otpad od dorade cvjetova kamilice sa aktivnošću neutralizacije DPPH od 61,5%.

5. Otpad od dorade cvjetova kamilice se u velikoj mjeri može smatrati bogatim izvorom derivata kumarina – umbeliferona. Umbeliferon se često koristi u kozmetičkoj industriji jer ima veliku sposobnost apsorbiranja ultraljubičastog zračenja i moguće ga je ekstrahirati iz biljnog materijala različitim tehnikama ekstrakcije. U tu svrhu su u ovom radu uspoređene različite metode ekstrakcije, od kojih se kao najučinkovitija pokazala ekstrakcija vodenom otopinom etanola (maceracija). Ekstrakti dobiveni maceracijom su imali najveći udio umbeliferona i pokazivali su značajnu antioksidacijsku aktivnost.

6. Ekstrakti kamilice dobiveni pomoću ekološki prihvatljive SC-$CO_2$ ekstrakcije su sasvim prirodni, bez rezidua organskih otapala te su odmah nakon ekstrakcije spremni za daljnju upotrebu u kozmetičkoj industriji kao dodaci u kozmetičkim preparatima.

7. Novo razvijeni sustav maceracije pod visokim tlakom značajno smanjuje vrijeme ekstrakcije uz dobivanje veće količine ekstrakata s većim udjelom tvari koje doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.

# 7. LITERATURA

Abbas KA, Mohamed A, Abdulamir AS, Abas HAA: Review on supercritical fluid extraction as new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4:345-353, 2008.

Ahmed J, Rahman MS: *Handbook of Food Process Design*. Wiley-Blackwell: Chichester, 2012.

Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa L.*) ulja superkritičnim CO2 iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.

Ames GR, Matthews WSA: The distillation of essential oils. *Tropical Science* 10:136-148, 1968.

Anonymous: Azulene in pharmacy and cosmetics. *Dragoco Report* 16:23-5, 1969.

Askin R, Ötles A: Supercritical fluids. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 4:3-16, 2005.

Bajerova P, Adam M, Bajer T, Ventura K: Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. *Journal of Separation Sciences* 37:835-844, 2014.

Bijuk M: Optimizacija procesa ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim $CO_2$ primjenom metode odzivnih površina. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.

Bourinbaiar AS, Tan X, Nagorny R: Inhibitory effect of coumarins on HIV-1 replication and cell-mediated or cell-free viral transmission. *Acta Virologica* 37:241-250, 1993.

Bradley P. *The British herbal compendium*. 1. izd., London: British Herbal Medicine Association, 1992.

Capuzzo A, Maffei ME, Occhipinti A: Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules* 18:7194-7238, 2013.

Chanfrau JER, Ferrada CR: Harvest time influences on coumarin and umbelliferone contents in extracts of *Justicia pectoralis Jacq*. (tilo). *Revista Cubana de Farmacia* 48:477-485, 2014.

Crevin JK, Philpott J: *Herbal medicine past and present.* 1. izd., SAD: Duke University Press, 1990.

Eliašova A, Repčak M, Pastirova M: Quantitative changes of secondary metabolites of *Matricaria chamomilla* by abiotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c:543-548, 2004.

Felfoldi-Gava A, Szarka S, Simandi B, Blazics B, Simon B, Kary A: Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *The Journal of Supercritical Fluids* 61:55-61, 2012.

Fluck H. *Medicinal plants and authentic guide to natural remedies*. 1. izd., London: W. Foulsham and Co. Ltd, 1988.

Formisano C, Delfine S, Oliviero F, Tenore GC, Rigano D, Senatore F: Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Industrial Crops and Products* 63:256-263, 2015.

Gould L, Reddy CV, Compreht FF: Cardiac effect of chamomile tea. *The Journal of Clinical Pharmacology* 13:475–9, 1973.

Gowda TNV, Farooqi AA, Subbaiah T, Raju B: Influence of Plant density, Nitrogen and Phosphorus on growth, yield and essential oil content of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Indian Perfumers* 35:168-72, 1991.

Gupta V, Mittal P, Bansal P, Khokra SL, Kaushik D. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Researchnt* 2:12-6, 2010.

Heldmaier M, Beyer-Koschitzke J, Stahl-Biskup E: Oil extracts of herbal drugs – optimisation of the extraction parameters. *Pharmazie* 64:403-406, 2009.

Ivens GM: Stinking mayweed. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 138:21-3, 1979.

Jerković I, Radonić A: *Praktikum iz organske kemije.* Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.

Jokić S, Horvat G, Aladić K: *Design of SFE system using a holistic approach-problems and challenges*. U: Lindy J (Ur.). Supercritical Fluid Extraction: Technology, Applications and Limitations. New York: Nova Science Publishers Inc; str. 95-122, 2015.

Jokić S, Bijuk M, Aladić K, Bilić M, Molnar M: Optimization of supercritical $CO_2$ extraction of grape seed oil using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology* 51:403-410, 2016.

Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkritičnim $CO_2$. *Doktorska disertacija*, Osijek, 2011.

Jun X: High-pressure processing as emergent technology for the extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53:837-852, 2013.

Kotnik P, Škerget M, Knez Ž: Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids* 43:192-198, 2007.

Lovrić T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Zagreb: HINUS Miramarska 13 b, 2003.

Mann C, Staba EJ: *The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile*. U: Craker LE, Simon JE (Ur.). Herbs, spices and medicinal plants-recent advances in botany, horticulture and pharmacology. USA: Haworth Press Inc; str. 235-80, 2002.

Masada Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. 1. izd. New York: John Wiley and Sons, Inc; 1976.

Mukhopadhyay M: *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Boca Raton: CRC Press; 2000.

Ness A, Metzger JW, Schmidt PC: Isolation, identification and stability of 8-desacetylmatricine, a new degradation production product of matricine. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 71:265-271, 1996.

Pamukov D, Achtardziev CH: *Natural pharmacy (in Slova*). 1. izd. Priroda: Bratislava; 1986.

Petrulova-Poracka V, Repcak M, Vilkova M, Imrich, J: Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. *Food Chemistry* 141:54-59, 2013.

Pietta P: Simultaneous isocratic high-performance liquid chromatographic determination of flavones and coumarins in *Matricaria chamomilla* extracts. *Journal of Chromatography* 404:279-281, 1987.

Redaelli C, Formentini L, Santaniello E: HPLC Determination of coumarins in *Matricaria chamomilla*. *Planta Medica* 43:412-413, 1981.

Repcak M, Suvak M: Methyl jasmonate and Echinothrips americanus regulate coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Systematics and Ecology* 47:38-41, 2013.

Repcak M, Imrich J, Franekova M: Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Journal of Plant Physiology* 158:1085-1087, 2001.

Reverchon E, Senatore F: Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:154-158, 1994.

Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C: Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry* 68(6):1033-1039, 1996.

Roby MHH, Sarhana MA, Selima KAH, Khalel KI: Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare L.)* and chamomile (*Matricaria chamomilla L*.). *Industrial Crops and Products* 44:437-445, 2013.

Sarkar R, Arora P, Garg KV: Cosmeceuticals for hyperpigmentation: What is available?. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 6:4-11, 2013.

Scalia S, Giuffreda L, Pallado P: Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21:549-558, 1999.

Schilcher H, Imming P, Goeters S: Pharmacology and Toxicology. U: Franke R, Schilcher H (Ur.), *Chamomile Industrial Profiles*. Boca Raton: CRC Press, 2005.

Schilcher H, Kamille D: *Handbuch fur arzte, apotheker und andere naturwissenschaftler*. 1. izd. Njemačka: Wissenschaft Verlagsgesellschaft. Stuttgart, 1987.

Silvan AM, Abad MJ, Bermejo P, Sollhuber M, Villar A: Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *Journal of Natural Products* 59:1183-1185, 1996.

Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK: Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews* 5:82-95, 2011.

Skala D, Žižović I, Petrović S. Etarska ulja – destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet. *Hemijska industrija* 53, 123-139.

Skalicka-Wozniak K, Głowniak K: Pressurized liquid extraction of coumarins from fruits of *Heracleum leskowii* with application of solvents with different polarity under increasing temperature. *Molecules* 17:4311-4141, 2012.

Stanojevic Lj, Stankovic M, Nikolic Lj, Nikolic V: The influence of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and composition of ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 13:199-204, 2007.

Subiza J, Subiza JL, Alonso M, Hinojosa M, Garcia R, Jerez M, Subiza E: Allergic conjunctivitis to chamomile tea. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 65:127-32, 1990.

Tyihak E, Sarkany-Kiss J, Verzar-Petri G: Phytochemical investigation of apigenin glycosides of *Matricaria chamomilla*. *Pharmazie* 17:301-4, 1962.

Council of Europe: *European Pharmacopoeia*. 8th ed. 67075 Strasbourg Codex, France: 2014.

Weber US, Steffen B, Siegers CP: Antitumor-activities of coumarin, 7- hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 99:193-206, 1998.