

**UTICAJ TEHNIKE EKSTRAKCIJE NA KINETIKU, PRINOS I  
ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA ETILACETATNIH EKSTRAKATA  
*Hieracium pilosella* L.\***

**Ljiljana Stanojević, Mihajlo Stanković, Vlada Veljković, Milorad Cakić,  
Vesna Nikolić, Dušica Ilić**  
Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

U radu je ispitan uticaj tri tehnike ekstrakcije (maceracija uz refluks, Soxhlet ekstrakcija i Tillepape ekstrakcija) na kinetiku, prinos i antioksidativna svojstva etilacetatnih ekstrakata *Hieracium pilosella* L. Antioksidativna aktivnost ekstrakata na stabilni 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikal određena je spektrofotometrijski. Sadržaj ukupnih fenola je određen Folin-Ciocalteu-ovom metodom, a sadržaj ukupnih flavonoida spektrofotometrijskim određivanjem primenom  $AlCl_3$ . Definisani su kinetički modeli: model Ponomarjeva (A) i model nestacionarne difuzije (B) ekstrakcije maceracijom, Tillepape i Soxhlet ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija. Najveći prinos ukupnih ekstraktivnih materija dobijen je Soxhlet ekstrakcijom, za vreme od 240 minuta. U ekstraktima je određen visok sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata se malo razlikuje, zavisno od primenjene tehnike ekstrakcije. Ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom ima veći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida i pokazuje bolju antioksidativnu aktivnost od ekstrakata dobijenih maceracijom uz refluks i Tillepape ekstrakcijom. Dobijeni rezultati pokazuju da se etilacetatni ekstrakti *Hieracium pilosella* L. mogu upotrebiti kao prirodni antioksidansi.

Ključne reči: Tehnike ekstrakcije, *Hieracium pilosella* L., fenoli, flavonoidi, antioksidativna aktivnost

---

\* Rad saopšten na IX Simpozijumu "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac, 21. i 22. oktobar 2011. godine  
Adresa autora: Ljiljana Stanojević, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124,  
16000 Leskovac, Srbija  
E-mail: ljiljas76@yahoo.com

## UVOD

*Hieracium pilosella* L. (Asteraceae) je višegodišnja zeljasta biljka [1], rasprostranjena u zoni hrastovih šuma [2]. *Hieracium pilosella* L. sadrži brojne fenolne komponente [3,4]. U svim *Hieracium* vrstama najzastupljenije su: hlorogena kiselina, 3,5-dikafeoilhinska kiselina, i luteolin 7-O glukozid [5].

Zbog svojih farmakoloških karakteristika *Hieracium pilosella* L. je pre svega medicinska biljka. Fenolne kiseline i flavonoidi koji se nalaze u biljci su prirodni antioksidansi [6,7], koji, pored toga poseduju antimutagena i antikancerogena [8] svojstva. Vodeno-etanolni ekstrakti nalaze primenu u lečenju upale mokraćnih puteva, izbacivanje kamena i peska iz bubrega i mokraćnih puteva i kao diuretici [1]. Trouillas i saradnici su u istraživanjima na različitim biljnim vrstama sa teritorije Francuske utvrdili antioksidativnu, antiinflamatornu i antiproliferativnu aktivnost vodeno-etanolnih rastvora *H. pilosella* L. [9]. Vodeni, etanolni i metanolni ekstrakti *H. pilosella* sa teritorije Srbije pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost [10,11]. Postoje podaci o antioksidativnoj i antimikrobnoj aktivnosti metanolnih, dihlormetan:metanolnih i etilacetatnih ekstrakata iz ove biljne vrste, dobijenih klasičnom maceracijom na sobnoj temperaturi [10]. *H. pilosella* L. se kod nas koristi i kao narodni lek kod bronhitisa, bronhijalne astme, vodene bolesti, edema i za lečenje spoljnih rana. Posebno se preporučuje za pojačano mokrenje i izbacivanje mulja, peska i sitnijih kamenčića iz mokraćnih puteva [12]. Oksidacione reakcije mogu proizvoditi slobodne radikale, koji u organizmu nastaju kao međuprodukti metaboličkih procesa. Molekuli koji imaju sposobnost da inhibiraju stvaranje slobodnih radikala ili da direktnim dejstvom uklone već stvorene slobodne radikale nazivaju se antioksidansima [13]. Naučna istraživanja usmerena su na sintezu veštačkih i izolovanje prirodnih antioksidanasa [14]. Ito i saradnici [15] navode da sintetički antioksidansi stimulišu nastajanje karcinoma kod ljudi. U poslednje vreme sve veću pažnju zaokupljaju biljke sa antioksidativnom aktivnošću, zbog pojave sve većeg broja malignih oboljenja. Smatra se da su ova oboljenja izazvana štetnim delovanjem slobodnih radikala [16].

U dostupnoj literaturi postoje podaci o uticaju tehnike ekstrakcije na kinetiku i sastav etanolnih i metanolnih ekstrakata zečje lobode [17,18] dok ovakvih podataka o etilacetatnim ekstraktima nema, kao ni podataka o uticaju tehnike ekstrakcije na antioksidativna svojstva etilacetatnih ekstrakata.

Cilj ovog rada je da se na osnovu uporednih ispitivanja prinosa ekstraktivnih materija i kinetike ekstrakcije maceracijom, Soxhlet i Tillepape ekstrakcijom definiše optimalna tehnika ekstrakcije kojom se ostvaruju maksimalni prinosi ekstraktivnih materija, fenola i flavonoida i najbolja antioksidativna aktivnost, i odrede parametri u jednačinama kinetike ekstrakcije.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Biljni materijal

*Hieracium pilosella* L., (koren i nadzemni deo, bez cveta) ubrana jula 2010., lokalitet Lebane, Jugoistočna Srbija. Biljni materijal je sušen u hladovini na promaji, skladišten

u papirnatim kesama i čuvan na sobnoj temperaturi. Neposredno pre ekstrakcije biljni materijal je samleven.

### **Reagensi i hemikalije**

Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD). Galna kiselina, rutin, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), aluminijum hlorid i kalijumacetat (Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD). Etilacetat (Lachema, Češka). Sve ostale hemikalije su analitičkog stepena čistoće (p.a.).

### **Sadržaj vlage u biljnom materijalu**

Sadržaj vlage u biljnom materijalu određen je na aparatu SCALTEC SMO 01 (Scaltec Instruments, Germany). Usitnjen i homogenizovan biljni materijal (1 g) sušen je na 105 °C do konstantne mase. Iz razlike masa nesušenog i sušenog materijala određen je sadržaj vlage.

### **Sadržaj ukupnih ekstraktivnih materija (UEM) u biljnom materijalu**

Usitnjen i homogenizovan biljni materijal (10 g) je smešten u ekstrakcioni deo aparature po Soxhlet-u. U prihvatni sud je stavljeno 200 cm<sup>3</sup> rastvarača (etilacetat) i vršena ekstrakcija na temperaturi ključanja rastvarača u toku 6 sati. Rastvarač je uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču na 40 °C. Dobijeni ekstrakt je sušen u vakuum sušnici na 50 °C do konstantne mase i izračunat sadržaj ekstraktivnih materija u biljnom materijalu.

### **Ekstrakcija maceracijom uz refluks**

Usitnjeni i homogenizovani biljni materijal (3 g) ekstrahuje se uz refluks sa solvomodulom (odnos biljni materijal : rastvarač) 1:20 m/v na temperaturi ključanja rastvarača za vreme od 180 minuta. Nakon ekstrakcije tečni ekstrakt se odvaja od biljnog materijala filtriranjem uz vakuum. Tečni ekstrakt se uparava na rotacionom vakuum uparivaču na 40 °C do konstantne mase. Prinos UEM (suvog ekstrakta, u g/100g suvog biljnog materijala) se izračunava iz mase izdvojenog ekstrakta i mase suvog biljnog materijala.

### **Soxhlet ekstrakcija**

Usitnjen i homogenizovan biljni materijal (10 g) je spakovan u čauru od filter papira i postavljen u ekstrakcioni deo aparature po Soxhlet-u. U ekstrakcioni sud je sipano 200 cm<sup>3</sup> etilacetata koji se zagreva do temperature ključanja rastvarača, za vreme od 240 minuta. Nakon ekstrakcije tečni ekstrakt se uparava na vakuum uparivaču do konstantne mase.

### **Tillepape ekstrakcija**

Usitnjen i homogenizovan biljni materijal (10 g) je spakovan u čauru od filter papira i postavljen u aparaturi po Tillepape-u. U ekstrakcioni sud je sipano 200 cm<sup>3</sup> etilacetata koji se zagreva do temperature ključanja rastvarača, za vreme od 240 minuta. Nakon

završene ekstrakcije tečni ekstrakt se uparava na vakuum uparivaču do konstantne mase.

### UV-VIS spektrofotometrija

Sva snimanja vršena su na UV-VIS spektrofotometru VARIAN Cary-100 Conc. Spectrophotometer. Snimanje se vrši u kvarcnim kivetama  $1 \times 1 \times 4,5$  cm.

### Ukupni fenoli u ekstraktima (Folin-Ciocalteu-ova metoda)

Sadržaj ukupnih fenola određen je u ekstraktima po proceduri Folin-Ciocalteu-a. Dobijeni etilacetatni ekstrakti su upareni na  $40^{\circ}\text{C}$  na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ekstrakti su rastvarani u metanolu. Po  $1\text{ cm}^3$  ekstrakata koji su dobijeni pod optimalnim uslovima, različitim tehnikama ekstrakcije (maceracija uz refluks, ekstrakcija po Soxhlet-u i Tillepape) ili standarda galne kiseline ( $25\text{-}500\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) prenešeno je u normalni sud od  $25\text{ cm}^3$  i dodato  $9\text{ cm}^3$  destilovane vode. Slepna proba umesto ekstrakta sadrži  $10\text{ cm}^3$  destilovane vode. Na rastvor uzoraka dodat je Folin-Ciocalteu-ov reagens za fenole ( $1\text{ cm}^3$ ), a zatim nakon 5 minuta i  $10\text{ cm}^3$   $7\%$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Smeša se energično meša. Nakon inkubacije (90 minuta) na sobnoj temperaturi izmerena je apsorbanca na  $765\text{ nm}$ . Ukupni fenoli se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline mg GKE/g suvog ekstrakta [19-21].

$$A_{765} = 0,431 \cdot c_{\text{GK}} - 9,33 \cdot 10^{-3}, R^2 = 0,9992 \quad (1)$$

### Ukupni flavonoidi u ekstraktima

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum hloridom. U  $2\text{ cm}^3$  uzorka (suvog etilacetatnog ekstrakta rastvorenog u metanolu do odgovarajuće koncentracije, dobijenog pod optimalnim uslovima, različitim tehnikama ekstrakcije (maceracija uz refluks, Soxhlet i Tillepape ekstrakcija) ili standarda rutina ( $5\text{-}100\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) dodato je  $0,1\text{ cm}^3$   $10\%$   $\text{AlCl}_3$  heksahidrata,  $0,1\text{ cm}^3$   $1\text{M}$   $\text{CH}_3\text{COOK}$  i  $2,8\text{ cm}^3$  destilovane vode. Posle inkubacije od 40 minuta na sobnoj temperaturi merena je apsorbanca reakcione smeše na  $415\text{ nm}$  u odnosu na slepu probu. Na osnovu kalibracione krive određen je sadržaj ukupnih flavonoida. Rezultati se izražavaju kao ekvivalent rutina mgRE/g suvog ekstrakta [22].

$$A_{415} = 14,171 \cdot c_{\text{R}} + 4,61 \cdot 10^{-2}, R^2 = 0,9991 \quad (2)$$

### Antioksidativna aktivnost (DPPH-test)

Sposobnost jedinjenja da hvataju slobodne 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikale se određuje tzv. DPPH testom [23-25]. Dobijeni etilacetatni ekstrakti su upareni na  $40^{\circ}\text{C}$  na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ekstrakti su rastvarani u metanolu i napravljena serija metanolnih rastvora različite koncentracije. Metanolni rastvor DPPH radikala ( $1\text{ cm}^3$ ,  $300\ \mu\text{mol}$  rastvor ( $3 \times 10^{-4}\text{ mol}/\text{dm}^3$ )) je dodat u  $2,5\text{ cm}^3$  ekstrakta različitih koncentracija. Ovaj postupak radi se u dve probe. Jednom uzorku odmah je merena apsorbanca na  $517\text{ nm}$ , drugi uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturi, u mraku, 20 min i merena apsorbanca. Apsorbanca na  $517\text{ nm}$  je određena i za čist metanolni rastvor DPPH radikala razblaženog u navedenom odnosu ( $1\text{ cm}^3$  DPPH radikala kome je dodato  $2,5\text{ cm}^3$  metanola), i za ekstrakt pre tretiranja DPPH radikalom

(2,5 cm<sup>3</sup> ekstrakta kome je dodat 1 cm<sup>3</sup> metanola). Za slepu probu se uzima metanol. Kapacitet hvatanja slobodnih radikala se izračunava po sledećoj formuli:

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (\%)} = 100 - \left[ (A_U - A_B) \times \frac{100}{A_K} \right] \quad (3)$$

$A_U$  = Apsorbancija „uzorka“ na 517 nm (metanolni rastvor ekstrakta tretiran rastvorom DPPH radikala).  $A_B$  = Apsorbancija „blank-a“ na 517 nm (metanolni rastvor ekstrakta koji nije tretiran rastvorom DPPH radikala).  $A_K$  = Apsorbancija „kontrole“ na 517 nm (metanolni rastvor DPPH radikala, razblažen u odnosu 1 cm<sup>3</sup> DPPH radikala koncentracije  $3 \times 10^{-4}$  moldm<sup>-3</sup> kome je dodato 2,5 cm<sup>3</sup> metanola).

## REZULTATI I DISKUSIJA

Sadržaj vlage u biljnom materijalu iznosi 14,87 %, a sadržaj UEM izražen na suvi biljni materijal iznosi 10,34 g/100g suvog biljnog materijala. Maksimalni sadržaj UEM u biljnom materijalu dobijen ekstrakcijom etilacetatom (10,34 g/100 g suvog biljnog materijala) znatno je manji od sadržaja UEM dobijenog ekstrakcijom vodom i vodenom-alkoholnim rastvorima [11,18].

Prinos UEM dobijen maceracijom uz refluks, Tillepape i Soxhlet ekstrakcijom etilacetatom iznosi 9,21; 9,75 i 9,89 g/100 g suvog biljnog materijala, respektivno. Najveći prinos UEM dobija se Soxhlet ekstrakcijom. Dobijeni prinos veći je od prinosa ostvarenih maceracijom uz refluks i Tillepape ekstrakcijom za 6,87 i 1,42 %, respektivno. Veći prinosi UEM ostvareni Soxhlet i Tillepape ekstrakcijom posledica su cirkulacionog toka rastvarača do potpunog iscrpljenja biljnog materijala.

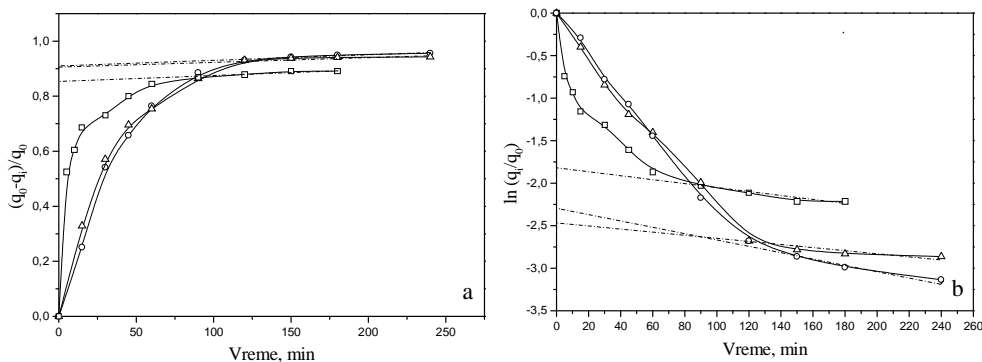
Za modelovanje kinetike ekstrakcije UEM etilacetatom korišćena su dva dvo-parametarska kinetička modela: model Ponomarjeva [26] (model A) i model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal [27] (model B). U tabeli 1 dat je prikaz kinetičkih modela ekstrakcije UEM iz biljnog materijala, korišćenih u ovom radu.

Tabela 1. Kinetički modeli ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljnih materijala

Model	Kinetička jednačina	Linearna transformacija
Teorija nestacionarne difuzije u biljnom materijalu	$\frac{q_i}{q_0} = (1-b) \cdot e^{-kt}$	$\ln \frac{q_i}{q_0} = \ln(1-b) - k \cdot t$
Jednačina Ponomarjeva		$\frac{q_0 - q_i}{q_0} = b + k \cdot t$

Količina ekstraktivnih materija prisutnih u biljnom materijalu na početku,  $q_0$ , i posle određenog vremena ekstrakcije,  $q_i$ .  $b$  – koeficijent brze ekstrakcije,  $k$  – koeficijent spore ekstrakcije.

Na slici 1a prikazana je zavisnost  $(q_0 - q_i)/q_0$  (model A), a na slici 1b zavisnost  $\ln(q_i/q_0)$  (model B), UEM od vremena ekstrakcije različitim tehnikama ekstrakcije pod definisanim operativnim uslovima ekstrakcije (solvomodul: 1:20 m/v, temperatura ključanja).



Slika 1. Zavisnost  $(q_0 - q_i)/q_0$  (a) i  $\ln(q_i/q_0)$  (b) UEM od vremena ekstrakcije pri različitim tehnikama ekstrakcije etilacetatom ( $\square$  - ekstrakcija maceracijom uz refluks,  $\circ$  - Soxhlet ekstrakcija,  $\Delta$  - Tillepape ekstrakcija (solvomodul 1:20 m/v, temperatura ključanja rastvarača)

Kinetička jednačina koja je zasnovana na modelu nestacionarne difuzije kroz biljni materijal i jednačina Ponomarjeva mogu se koristiti za modelovanje procesa ekstrakcije u linerizovanom obliku pri čemu se period brze ekstrakcije kvantitativno karakteriše koeficijentom ispiranja, odnosno koeficijentom brze ekstrakcije  $b$ , a linearni deo ili period spore ekstrakcije koeficijentom spore ekstrakcije  $k$ , kao parametra koji karakteriše proces ekstrakcije ekstraktivnih materija iz nerazorenih ćelija biljnog materijala. Parametri kinetičkih jednačina su izračunati na osnovu eksperimentalnih podataka primenom metode linearne regresije linearizovanih oblika kinetičkih jednačina. Koeficijent linearne korelacije je bio veći od 0,94. Period brze ekstrakcije (PBE) i stepen ekstrakcije (SE) u periodu brze ekstrakcije za različite tehnike ekstrakcije etilacetatom prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Period brze ekstrakcije, stepen ekstrakcije u periodu brze ekstrakcije i vrednosti koeficijeneta  $b$  i  $k$  u jednačinama kinetike ekstrakcije

Tehnika ekstrakcije	PBE, min	SE, %	$b$	Model A	Model B	
				$k \times 10^4, \text{min}^{-1}$	$b$	$k \times 10^3, \text{min}^{-1}$
Maceracija uz refluks	90	86,8	0,85	2,70	0,84	2,19
Tillepape	120	93,1	0,92	0,92	0,92	1,43
Soxhlet	120	93,1	0,92	1,98	0,91	3,68

Analizom PBE i SE ukupnih ekstraktivnih materija za različite tehnike ekstrakcije po modelu Ponomarjeva vidi se da se za vreme perioda brze ekstrakcije ekstrahuje preko 86 % UEM (PBE, 90 minuta). Stepem ekstrakcije UEM veći je kod Tillepape i Soxhlet ekstrakcije, ali za duži vremenski period (PBE: 120 minuta). Poređenjem koeficijenata spore ekstrakcije,  $k$  u jednačinama kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija po modelu B i koeficijenata  $k$  u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu A, vidi se da su koeficijenti dobijeni po modelu B veći od koeficijenata dobijenih po modelu A. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 2 vidi se da se koeficijenti  $b$  u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu A i po modelu B neznatno razlikuju. Soxhlet i Tillepape

ekstrakcijom se u periodu brze ekstrakcije ostvaruje isti stepen ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija. Optimalna tehnika ekstrakcije etilacetatom sa kojom se ostvaruje najveći prinos u toku ekstrakcije od 240 minuta je Soxhlet ekstrakcija. Analizom dobijenih rezultata se vidi da oba kinetička modela mogu biti korišćena za modelovanje procesa ekstrakcije UEM etilacetatom iz *Hieracium pilosella* L.

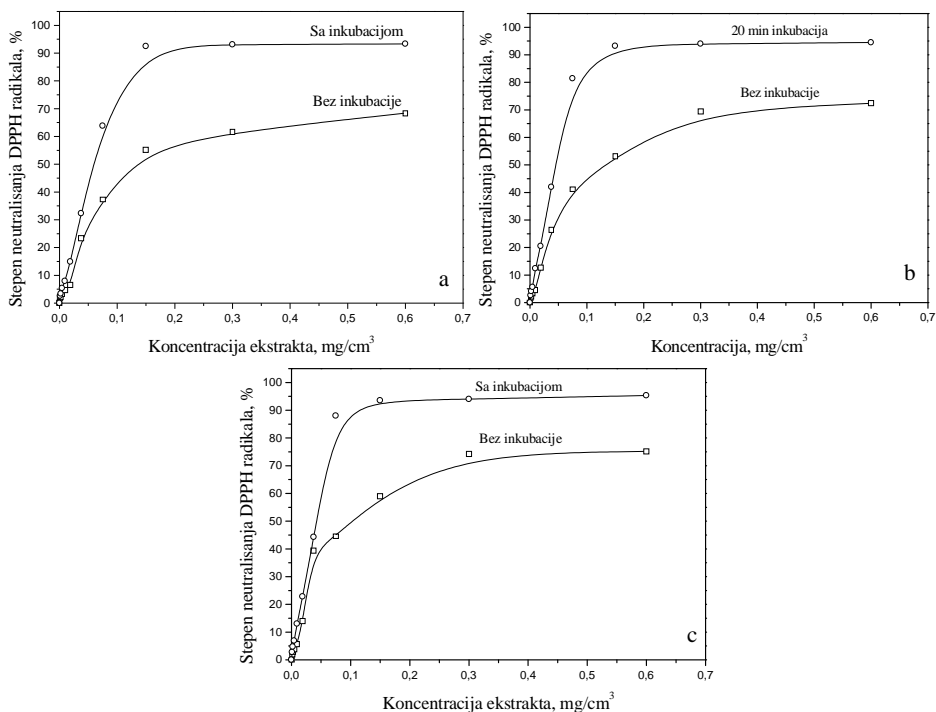
Na osnovu kalibracionih kriva galne kiseline i rutina, spektrofotometrijski je određen sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima (tabela 3). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima izražen u ekvivalentima galne kiseline može se podeliti u tri opsega: ekstrakti sa niskim (10 mg GKE/g suvog ekstrakta), srednjim (10-20 mg GKE/g suvog ekstrakta) i visokim (više od 40 mg GKE/g suvog ekstrakta) sadržajem ukupnih fenola. Biljni ekstrakti sa sadržajem fenolnih komponenti obično imaju i visok sadržaj flavonoida [28]. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 3) može se zaključiti da etilacetatni ekstrakti imaju visok sadržaj fenola i flavonoida nezavisno od primenjene tehnike ekstrakcije. Sadržaj ovih komponenti najveći je u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (razlike u sadržaju fenola su do 1,3 % a u sadržaju flavonoida do 2,8 %). Veći sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom verovatno je posledica cirkulacionog toka rastvarača do potpunog iscrpljenja biljne sirovine.

Tabela 3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etilacetatnim ekstraktima *Hieracium pilosella* L., dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije

Tehnika ekstrakcije	Sadržaj fenola mg GKE/g s.e.	Sadržaj flavonoida mg RE/g s.e.	Odnos flavonoidi/fenoli
Maceracija uz refluks	187,6	73,9	0,4
Tillepape	189,2	74,3	0,4
Soxhlet	190,1	76,0	0,4

s.e.-suvi ekstrakt

DPPH test se bazira na reakciji razmene atoma vodonika između antioksidanta i stabilnog DPPH radikala. U reakciji dolazi do redukcije intenzivno ljubičasto obojenog DPPH radikala do odgovarajućeg hidrazina, što se spektrofotometrijski prati preko pada apsorbancije na 517 nm. DPPH radikal je pogodan zbog visoke stabilnosti. S obzirom da se u etilacetatnim ekstraktima *Hieracium pilosella* L. nalaze komponente koje mogu reagovati sa DPPH radikalom ispitana je antiradikalna aktivnost ekstrakata dobijenih različitim tehnikama ekstrakcije (slika 2) pod definisanim operativnim uslovima.



Slika 2 Antioksidativna aktivnost etilacetatnog ekstrakta dobijenog maceracijom uz reflux (a), Tillepape (b) i Soxhlet ekstrakcijom (c) (solvomodul: 1:20 m/v, temperatura ključanja)

Sa koncentracijom inkubiranih uzoraka od 0,15 mg/cm<sup>3</sup> postiže se preko 90 % neutralizacije DPPH radikala za sva tri ekstrakta. Sa koncentracijom ekstrakta od 0,6 mg/cm<sup>3</sup> postiže se kapacitet neutralisanja DPPH radikala preko 93 % za inkubirane uzorke (93,3, 94,5 i 95,3 %, za ekstrakte dobijene maceracijom uz reflux, Tillepape i Soxhlet ekstrakcijom, respektivno) i oko 70 % za neinkubirane uzorke (68,4, 72,4 i 75,20 %, za ekstrakte dobijene maceracijom uz reflux, Tillepape i Soxhlet ekstrakcijom, respektivno). Sa porastom koncentracije inkubiranih uzoraka iznad 0,15 mg/cm<sup>3</sup> stepen neutralisanja DPPH radikala neznatno raste. Vrednosti stepena neutralisanja DPPH radikala za sva tri ekstrakta se malo razlikuju, zavisno od primenjene tehnike ekstrakcije. Najbolju antioksidativnu aktivnost pokazao je ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom. Sa slika se vidi da kapacitet neutralisanja DPPH radikala raste sa porastom koncentracije ekstrakata kako za inkubirane uzorke tako i za uzorke bez inkubacije. Inkubirani ekstrakti pokazuju bolju antioksidativnu aktivnost. Iz ovih rezultata može se zaključiti da etilacetatni ekstrakti *Hieracium pilosella* L. pokazuju antioksidativnu aktivnost u malim koncentracijama. Nosioci antioksidativne aktivnosti su verovatno fenoli i flavonoidi koji su ekstrahovani iz biljnog materijala [6,7]. Brojnim istraživanjima utvrđena je značajna korelacija između sadržaja fenolnih materija i antioksidativne aktivnosti [28].



## ZAKLJUČAK

Primenjena tehnika ekstrakcije ima uticaja na prinos UEM, kinetiku ekstrakcije i antioksidativna svojstva ekstrakata. Najveći prinos UEM dobija se Soxhlet ekstrakcijom, za vreme od 240 minuta. Ispitivanjem kinetike ekstrakcije UEM utvrđeno je da postoje brzi i spori period ekstrakcije. Period brze ekstrakcije je kraći kod maceracije uz refluks (90 minuta) u odnosu na Tillepape i Soxhlet ekstrakciju (120 minuta). Za modelovanje kinetike ekstrakcije maceracijom, Tillepape i Soxhlet ekstrakcije UEM primenjena su dva kinetička modela: model Ponomarjeva i model nestacionarne difuzije i određeni parametri u jednačinama kinetike ekstrakcije. Određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da etilacetatni ekstrakti imaju visok sadržaj fenola i flavonoida nezavisno od primenjene tehnike ekstrakcije. Sadržaj ovih komponenti najveći je u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom. Ispitivani ekstrakti pokazuju dobru, koncentracijski zavisnu antioksidativnu aktivnost, nezavisno od primenjene tehnike ekstrakcije. Najbolju antioksidativnu aktivnost pokazao je ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom. Prezentovani podaci o sadržaju ukupnih fenolnih komponenti i flavonoida u etilacetatnim ekstraktima i antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata pokazuju da dobijeni ekstrakti predstavljaju potencijalni izvor prirodnog antioksidanta.

## Zahvalnica

Rad je deo istraživanja u okviru projekta „Biljni i sintetski bioaktivni proizvodi novije generacije”, br. TR 34012, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

## Literatura

- [1] J. Tucakov, Lečenje biljem, RAD-Beograd, Beograd, 1997.
- [2] G. Grasskopf, L.A. Smith, P. Syrett, Biol. Contr. 24 (2002) 7-19.
- [3] W. Makepeace, E.T. Dobson, D. Scott, J. Bot. 23 (1985) 79-90.
- [4] V. Švehlíková, P. Mráz, S. Piacente, K. Marhold, Biochem. System. Ecol. 30 (2002) 1037-1049.
- [5] S.D. Petrović, M.S. Gorunović, V. Wray, I. Merfort, Phytochemistry 50 (1999) 293-296.
- [6] I. Konczak, S. Okuno, M. Yoshimoto, O. Yamakawa, J. Biomed. Biotechn. 5 (2004) 287-292.
- [7] M. Kosar, D. Dorman, K. Baser, R. Hiltunen, Chrom. 60 (2004) 635-638.
- [8] M. Kampa, V.I. Alexaki, G. Notas, A.P. Nifli, A. Nistikaki, A. Hetzoglou, Breast Cancer Res. 6 (2004) 63-74.
- [9] P. Trouillas, C.-A. Calliste, D.-P. Allais, A. Simon, A. Marfak, C. Delage, J.-L. Duroux, Food Chem. 80 (2003) 399-407.
- [10] Lj.P. Stanojević, M.Z. Stanković, V.D. Nikolić Lj.B. Nikolić, J. Serb. Chem. Soc. 73 (5) (2008) 531-540.

- [11] Lj. Stanojević, M. Stanković, V. Nikolić, Lj. Nikolić, D. Ristić, J. Čanadanovic-Brunet, V. Tumbas, *Sensors*, 9 (2009) 5702-5714.
- [12] N. Randelović, Ž. Jeremić, V. Stamenković, *Lekovito bilje timočke krajine, Fitoterapija II, Zaječar 1995*, p. 72
- [13] K. Haila, Effects of carotenoids and carotenoid-tocopherol interaction on lipid oxidation in vitro. Academic dissertation, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, 1999.
- [14] J. Čanadanović-Brunet, *Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti*, Beograd, 1998.
- [15] N. Ito, S. Fukushima, H. Tsuda, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 15 (1985) 109-115.
- [16] Z. Spacil, L. Novakova, P. Solich, *Talanta* 76 (2008) 189–199.
- [17] Lj.P. Stanojević, M.Z. Stanković, M.D. Cakić, V.D. Nikolić, Lj.B. Nikolić, D.P. Ristić, *Hem. Ind.* 63 (2) (2009) 79–86.
- [18] Lj. Stanojević, M. Stanković, Lj. Nikolić, V. Nikolić, The effect of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and composition of ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L., *Chem. Ind. Chem. Eng. Quarterly* 13 (4) (2007) 199-204.
- [19] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, *Meth. Enzymol.* 299 (1999) 152–178.
- [20] J. Singh, A.K. Upadhyay, K. Prasad, A. Bahadur, M. Rai, *J. Food Comp. Anal.* 20 (2007) 106-112.
- [21] M.P. Kähkönen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen, 47 (1999) 3954-3962.
- [22] J.-Y. Lin, C.-Y. Tang, *Food Chem.* 101 (2007) 140–147.
- [23] R. Aquino, S. Morelli, A. Tomaino, M. Pellegrino, A. Saija, L. Grumetto, C. Puglija, D. Ventura, F. Bonina, *J. Ethnopharm.* 79 (2002) 183-191.
- [24] W.C. Choi, C.S. Kim, S.S. Hwang, K.B. Choi, J.H. Ahn, Y.M. Lee, H.S. Park, K.S. Kim, *Plant Sci.* 163 (2002) 1161-1168.
- [25] C. Sanchez-Moreno, *Food Sci. Tech. Int.* 8 (3) (2002) 121-137.
- [26] Пономарев Б. Д., *Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина, Москва, 1976.*
- [27] V. Veljković, D. Milenović, *Hem. Ind.* 56 (2) (2002), 60-67.
- [28] P. Maisuthisakul, M. Suttajit, R. Pongsawatmanit, *Food Chem.* 100 (2007) 1409–1418.

## SUMMARY

### **THE EFFECT OF THE EXTRACTION TECHNIQUES ON THE KINETICS, YIELD AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF ETHYL ACETATE EXTRACTS OF *Hieracium pilosella* L.**

(Original scientific paper)

**Ljiljana Stanojević, Mihajlo Stanković, Vlada Veljković, Milorad Cakić, Vesna Nikolić, Dušica Ilić**

Faculty of Technology, Leskovac, Serbia

The influence of three extraction techniques (Reflux maceration, Soxhlet and Tillepape extraction) on the kinetics, yield and antioxidant activity of ethyl acetate extracts of *Hieracium pilosella* L. was investigated. The antioxidant activity of the extracts on stable 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical was determined spectrophotometrically. The total phenolic content was determined by using the Folin-Ciocalteu assay and the total flavonoids content was measured by spectrophotometric method with the application of  $AlCl_3$ . The extraction kinetics models (extraction by maceration, Tillepepe and Soxhlet extraction) for the extraction of total extractive matter were defined: model Ponomaryov (A) and non-stationary diffusion model (B). The highest yield of a dry extract was obtained by Soxhlet extraction, for a time period of 240 minutes. In the extracts a high content of total phenolics and flavonoids was determined. The antioxidant activity of the investigated extracts slightly differs depending on the extraction technique applied. The extract obtained by the Soxhlet extraction contained higher amounts of phenolic and flavonoid compounds and showed a better antioxidant activity than those obtained by maceration with reflux and Tillepape extraction. The obtained results show that the ethyl acetate extracts of *Hieracium pilosella* L. can be used as natural antioxidants.

Key words: Extraction techniques, *Hieracium pilosella* L., phenols, flavonoids, antioxidant activity

Primljen / Received: 16. maj 2011. godine

Prihvaćen / Accepted: 06. jun 2011. godine